



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2009

**SUSANA SEABRA
AVEIRO**

**AS PROTEÍNAS HBP/SOUL: SOBRE-EXPRESSÃO,
PURIFICAÇÃO E ESTUDO DE MUTANTES**



**SUSANA SEABRA
AVEIRO**

**AS PROTEÍNAS HBP/SOUL: SOBRE-EXPRESSÃO,
PURIFICAÇÃO E ESTUDO DE MUTANTES**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Brian James Goodfellow, Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha madrinha por todo o seu carinho e dedicação.

o júri

presidente

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Brian James Goodfellow
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria dos Anjos López Macedo
Professora auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

agradecimentos

Ao professor Brian James Goodfellow pela oportunidade que me deu em trabalhar com um tema tão interessante, pela disponibilidade, por todo o apoio prestado e pelos conhecimentos transmitidos ao longo destes últimos meses.

À professora Glória Ferreira, *College of Medicine, University of South Florida*, por me ter auxiliado na produção de variantes de HBP, demonstrando total disponibilidade quer em termos de recursos humanos quer em termos materiais.

Aos colegas do laboratório da Professora Glória Ferreira, principalmente ao Jerome e Thomas, pelo seu espírito de ajuda e pelos conhecimentos que me transmitiram.

Aos colegas da Espectrometria de Massa, pela disponibilização do material necessário para SDS-PAGE, bem como pela sua disponibilidade em apoiar no que fosse necessário.

Ao professor Edgar Silva, Departamento de Biologia, pela disponibilização das centrifugas e *EmulsiFlex*, essencial para a optimização da lise celular no processo de purificação proteica.

Ao professor Manuel Santos, pela disponibilização das incubadoras e shakers necessárias para o crescimento de culturas.

À professora Amparo Faustino por todo o seu apoio nos ensaios de extinção de fluorescência.

Ao João Paredes, por todo o apoio prestado na inoculação e crescimento de culturas.

Ao Filipe Freire, pela partilha de conhecimentos, espírito de ajuda e companheirismo.

Aos meus colegas de laboratório por todo o apoio que me deram e pelos momentos bem passados.

Às minhas sobrinhas Carolina e Catarina pela sua companhia, pelas brincadeiras, sorrisos, por me fazerem esquecer os momentos menos agradáveis.

Ao Alexandre, pela paciência nos momentos de mau humor, por todo o seu amor e dedicação.

A toda a minha família e amigos pelas palavras de incentivo e carinho de sempre!

palavras-chave

HBP, SOUL, Purificação, Extinção de Fluorescência, Mutagénese Dirigida.

resumo

O objectivo deste trabalho consistiu na optimização da purificação das proteínas HBP/SOUL que ligam ao grupo Hemo, bem como o estudo da interacção destas proteínas, e seus variantes, com grupos tetrapirrólicos.

Na optimização do processo de purificação, a lise celular foi uma das etapas estudadas, comparando-se a eficácia da lise celular através do uso de sonicação e alta pressão. Esta avaliação foi feita por comparação dos géis SDS-PAGE obtidos a partir dos extractos celulares. Para além da lise celular, foi também estudada a purificação por cromatografia de afinidade, com o recurso de resinas Ni-NTA, com o intuito de encontrar o melhor gradiente de imizadole para obter uma fracção de HBP/SOUL o mais pura possível.

A proteína mHBP foi posteriormente sujeita a estudos de extinção de fluorescência, quando exposta a compostos tetrapirrólicos nomeadamente a Hemina e a Protoporfirina IX. Estes estudos foram alargados a determinados mutantes da mHBP, nomeadamente a M59S, M63S, R181A, uma vez estes resíduos se situarem na região de ligação da mHBP aos compostos tetrapirrólicos. As constantes de dissociação determinadas indicam que a alteração da polaridade na região hidrofóbica de interacção da mHBP com o grupo Hemo, não tem efeitos significativos na afinidade da interacção destas duas moléculas.

Através da mutagénese dirigida foi possível a construção de mutantes de HBP nomeadamente R56A, R56E, K56A/K64A possibilitando assim no futuro, a continuação dos estudos de extinção de fluorescência de forma a compreender a função destas proteínas em relação ao grupo Hemo.

keywords

HBP, SOUL; Purification, Fluorescence Quenching, Site-Directed Mutagenesis.

abstract

The aim of this work was the optimization of purification of proteins HBP/SOUL that bind to Heme group, as well as the study of interaction of these proteins and their variants with tetrapyrrole compounds.

In the optimization of the purification process, cell lysis was studied by, comparing sonication with high pressure method. This evaluation was made by comparing SDS-PAGE gels of a cell extracts. In addition to cell lysis, purification by affinity chromatography, using Ni-NTA resins, was studied to find the best imidazole gradient to obtain a HBP/SOUL fraction as pure as possible.

The p22HBP protein was also studied by fluorescence quenching, when exposed to tetrapyrrole compounds such as Hemin and Protoporphyrin IX. These studies were extended to mHBP mutants, M59S, M63S, R181A, once these residues are located in the protein binding pocket. The dissociation constants show that the modification of polarity of this binding pocket, does not affect significantly the affinity of these compounds.

By site directed mutagenesis, it was also possible to construct the mHBP mutants, R56A, R56E, K56A/K64A allowing, in the future, the continuation of these studies of Fluorescence Quenching, to understand the main role of this proteins and how they affect the interaction with Hemo.

Índice

O JÚRI	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
PREFÁCIO	1
CAPÍTULO I- SOBRE-EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE HBP/SOUL- OPTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO	3
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 HBP/Soul - família de proteínas que ligam ao grupo Hemo	6
1.2 Células hospedeiras – <i>Escherichia coli</i>	10
1.3 Vectores	11
1.4 Sobre-expressão	14
1.5 Extracto proteico	15
1.6 Métodos de purificação proteica	16
1.7 Análise da purificação proteica – electroforese em gel	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Estirpes e plasmídeos	24
2.2 Armazenamento das estirpes bacterianas	25
2.3 Sobre-expressão e purificação da SOUL	25
2.4 Estudo da sonicação versus alta pressão	26
2.5 Estudo do gradiente de imidazole	27
2.6 SDS-PAGE	28
2.7 Concentração	29
2.8 Sobre-expressão e purificação da HBP	30
2.9 Quantificação	31
3 RESULTADOS	32
3.1 Estudo da sonicação versus alta pressão	32
3.2 Estudo do gradiente de imidazole	33
3.3 Sobre-expressão e purificação da HBP	35
3.4 Quantificação	35
4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	37

CAPÍTULO II – EXTINÇÃO DE FLUORESCÊNCIA	39
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 <i>Preparação da amostra</i>	46
2.2 <i>Leituras</i>	46
3 RESULTADOS	47
3.1 <i>Espectros de emissão</i>	47
3.2 <i>Determinação da Constante de Dissociação</i>	48
4 DISCUSSÃO	51
CAPÍTULO III – CONSTRUÇÃO DE VARIANTES DE HBP	53
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1 <i>Purificação do plasmídeo pNJ2</i>	67
2.2 <i>Primers</i>	68
2.3 <i>Megaprimers</i>	69
2.4 <i>Whole Plasmid PCR</i>	71
2.5 <i>Tratamento com Dpn I</i>	71
2.6 <i>.Preparação de células competentes</i>	72
2.7 <i>Transformação de células competentes</i>	72
2.8 <i>Preparação de DNA para sequenciação</i>	73
2.9 <i>Sequenciação</i>	75
3 RESULTADOS	76
3.1 <i>Megaprimers</i>	76
3.2 <i>Whole plasmid PCR</i>	77
3.3 <i>Tratamento com Dpn I</i>	78
3.4 <i>Transformação de células competentes</i>	79
3.5 <i>Preparação de DNA para sequenciação</i>	80
3.6 <i>Sequenciação</i>	81
4 DISCUSSÃO	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
ANEXOS	89
1 PLASMÍDEO HSOUL/IOH3379-PDEST17-D18	91
2 PLASMÍDEO PNJ2	92
3 SOLUÇÕES PARA A SOBRE-EXPRESSÃO DE HBP	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura do grupo Hemo.	7
Figura 2. Alinhamento da sequência proteica de p22HBP e SOUL de diferentes organismos.	9
Figura 3. Estrutura de p22HBP de rato resolvida por espectroscopia de RMN.	9
Figura 4. Fotografia de microscopia electrónica da <i>Escherichia coli</i> e representação esquemática.	11
Figura 5. Gráfico representativo do crescimento de uma cultura de <i>E. coli</i> e indução proteica.	14
Figura 6. Esquema representativo da cromatografia por troca iónica.	17
Figura 7. Esquema da cromatografia de exclusão molecular.	17
Figura 8. Representação da cromatografia de afinidade.	18
Figura 9. Interação entre os resíduos de Histidina da <i>His-tag</i> (a azul) e a resina Ni-NTA.	19
Figura 10. Gráfico de absorvância de extractos genéricos obtidos por cromatografia de afinidade.	19
Figura 11. SDS-PAGE: A- efeito desnaturante do SDS; B- esquema de uma cassette de SDS-PAGE.	21
Figura 12. Sequência que codifica a proteína hSOUL.	24
Figura 13. Sequência que codifica a mHBP.	24
Figura 14. Gel SDS-PAGE dos extractos obtidos, na purificação da SOUL, usando a alta pressão para a lise celular.	32
Figura 15. Gel SDS-PAGE dos extractos obtidos, na purificação da SOUL, usando a sonicação, (6x2 min.) para a lise celular.	32
Figura 16. Gel SDS-PAGE dos extractos obtidos, na purificação da SOUL, usando a sonicação, (12x1 min.) para a lise celular.	33
Figura 17. Gel SDS-PAGE obtido no estudo do gradiente de imidazole, na purificação da SOUL.	33
Figura 18. Gel SDS-PAGE obtido no estudo do gradiente de imidazole, na purificação da SOUL.	34
Figura 19. Gel SDS-PAGE obtido na purificação da HBP.	35
Figura 20. Espectro de absorvância da mHBP, diluída 1:25, entre 230 e 340 nm de λ .	36

Figura 21. Diagrama de Jablonski.	42
Figura 22. Estrutura 3D representativa do complexo mHBP (verde) - hemina (laranja).	45
Figura 23. Espectro de emissão em extinção de fluorescência da HBP-M59S, na presença de PPIX.	47
Figura 24. Gráfico que relaciona a intensidade de fluorescência da mHBP e respectivos variantes, com a concentração de Hemina em solução.	49
Figura 25. Gráfico que relaciona a intensidade de emissão fluorescência de HBP e respectivos variantes, com a concentração de PPIX em solução.	50
Figura 26. Estrutura representativa do complexo Hemina-mHBP e do complexo Hemina-hHBP.	55
Figura 27. Estrutura representativa do complexo PPIX-mHBP e do complexo PPIX-hHBP.	56
Figura 28. Esquema representativo da reação de PCR..	59
Figura 29. Zonas de restrição da enzima DpnI.	61
Figura 30. Estrutura de uma molécula de ddNTP e de molécula de dNTP.	64
Figura 31. Esquema representativo da truncagem, dos fragmentos de DNA através de ddGTP.	65
Figura. 32 Esquema representativo da truncagem dos fragmentos com os quatros ddNTPs.	65
Figura 33. Cromatograma resultante da sequenciação automática de um fragmento de DNA.	66
Figura 34. Plasmídeo pNJ2 e respectivas zonas de <i>annealing</i> de alguns <i>primers</i> .	68
Figura 35. Gel de agarose 1% dos produtos de PCR, <i>megaprimers</i> .	76
Figura 36. Gel de agarose 1% dos produtos de <i>whole-plasmid</i> PCR.	77
Figura 37. Gel de agarose 1% dos produtos de WP-PCR tratados com DpnI.	78
Figura 38. Gel de agarose 1% das preparações de DNA para sequenciação.	80
Figura 39. Cromatograma obtido por sequenciação do possível variante R56A.	81
Figura 40 Cromatograma obtido por sequenciação do possível variante R56E.	82
Figura 41. Cromatograma obtido por sequenciação do possível variante R56A/K64A.	82
Figura 42. Cromatograma obtido por sequenciação do possível variante K64A.	83

Lista de abreviaturas

amp ^r	Gene que codifica resistência à ampicilina
APS	Persulfato de amônio
ckSOUL	Soul presente nas células de galinha
ddATP	Dideoxiadenosina trifosfato
ddCTP	Dideoxicitosina trifosfato
ddGTP	Dideoxiguanina trifosfato
ddNTP	Dideoxinucleótido trifosfatado
ddTTP	Dideoxitimina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GST	Glutathione-S-transferase
GTE	Tampão Glucose-Tris-EDTA
hHBP	<i>Heme Binding Protein</i> presente nas células humanas
His-tag	Marcador de Histidinas
hSOUL	SOUL humana
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosidase
kan ^r	Gene que codifica resistência à Kanamicina
K _d	Constante de dissociação
LB	Meio Luria Bertani
M59S	<i>Heme Binding Protein</i> mutante, com uma serina no local da metionina 59
<i>MEGA-WHOP</i>	Whole plasmid PCR associado ao uso de <i>megaprimers</i>
mHBP	<i>Heme Binding Protein</i> presente nas células de rato
mSOUL	SOUL presente nas células de rato
Ni-NTA	Resina de níquel - ácido nitrilotriacético
OD	Densidade óptica
Ori	Origem de replicação
Pb	Pares de bases

PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PEG 8000	Polietileno glicol, massa molecular 8000
PPIX	Protoporfirina IX
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida – com desnaturação de amostras através da adição de dodecil sulfato de sódio.
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
USF	Universidade do sul da Florida, Estados Unidos da América
v/v	Concentração em percentagem de volume
WP-PCR	<i>Whole plasmid- polimerase chain reaction</i>

Prefácio

O presente trabalho teve como objectivo a optimização da purificação de proteínas da família HBP/SOUL bem como o estudo da interacção das mesmas com compostos tetrapirrólicos através da técnica de extinção de fluorescência. A construção de variantes de HBP, através de mutagénese dirigida, para estudos futuros de extinção de fluorescência foi também um dos objectivos alcançados neste trabalho.

A dissertação encontra-se dividida em três capítulos:

Capítulo I: Sobre-expressão e purificação de SOUL e HBP

Capítulo II: Extinção de fluorescência

Capítulo III: Produção de variantes de HBP

No primeiro capítulo, tendo em vista a optimização do processo de purificação desta família de proteínas, é avaliada a eficácia de diferentes métodos de lise celular bem como a cromatografia de afinidade através do uso de resinas de Níquel.

No segundo capítulo, são descritos os estudos de extinção de fluorescência com compostos tetrapirrólicos nomeadamente a Hemina e a Protoporfirina IX. Estes estudos baseiam-se na determinação das constantes de dissociação da mHBP e de mutantes, previamente indicados como intervenientes na interacção com os grupos tetrapirrólicos.

O último capítulo é dedicado à construção de variantes de HBP, sendo o processo de mutagénese dirigida o método seleccionado para introduzir as mutações desejadas. Os vectores portadores das mutações foram obtidos a partir do método MEGA-WHOP, no qual se constroem *megaprimers*, iniciadores das reacções de PCR de todo o plasmídeo modelo.

Capítulo I- Sobre-expressão e purificação de HBP/SOUL- optimização do procedimento

1 Introdução

O objectivo neste primeiro capítulo é otimizar o processo de purificação das proteínas HBP e SOUL, através da avaliação da eficácia dos processos de lise celular por sonicação e alta pressão, bem como o estudo do gradiente de imidazole a aplicar na coluna de cromatografia de afinidade.

O desenvolvimento de técnicas e métodos para a separação e purificação de macromoléculas biológicas tal como as proteínas tem sido um importante pré-requisito no progresso das ciências da vida [1]. A purificação de proteínas revela-se muitas vezes um passo importante em diferentes áreas de investigação como é o caso da bioquímica. Com os recentes avanços na clonagem de genes e consequente expressão, torna-se indispensável uma constante actualização nos métodos de purificação para o desenvolvimento de novas técnicas e aperfeiçoamento de resultados [2].

Muitos estudos que envolvem a caracterização de proteínas, tais como espectrometria de massa, espectroscopia de RMN, cristalografia de raios X, só podem ser aplicados se a proteína em causa puder ser isolada e separada das outras proteínas presentes na célula. As primeiras experiências de purificação proteica surgiram na década de 30 por Otto Warburg. Desde a sua primeira publicação, o repertório dos métodos de purificação proteica aumentaram consideravelmente. Na última década, o principal objectivo tem sido miniaturizar, automatizar e otimizar os princípios descobertos anteriormente [3].

Actualmente a sobre-expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*, leveduras, insectos ou mesmo células de mamífero facilitou a extracção de maiores quantidades de proteína purificada [3].

Uma das considerações a ter na expressão e purificação de proteínas recombinantes é a finalidade da proteína que vai ser expressa: para estudos bioquímicos e estruturais é importante otimizar as condições para que a proteína obtida seja solúvel e funcional enquanto que se for para a produção de antígenos a proteína poderá ser expressa quer num estado nativo ou desnaturante [4].

Ao longo de cada passo de purificação vão sendo perdidas pequenas quantidades de proteína, sendo então importante reduzir o número de etapas de purificação para aumentar a concentração de proteína purificada. No entanto, minimizando o número de etapas de concentração, diminui-se também o grau de purificação da proteína. Ter-se-á então que encontrar um equilíbrio entre o número de etapas de purificação e a minimização de perdas de proteína [2].

Um dos passos preliminares da purificação proteica é a lise celular, na qual são destruídas as paredes celulares dos hospedeiros, permitindo a libertação das proteínas para o meio extracelular. A eficácia desta etapa é crucial para o rendimento da purificação proteica, uma vez que quanto mais eficiente for a destruição das células, maior será a concentração de proteína presente no extracto [1].

Tendo em vista a optimização do processo de purificação de proteínas que ligam ao grupo Hemo, usou-se a proteína SOUL como referência estendendo-se depois esta optimização para a sobre-expressão e purificação de HBP (*Heme Binding Protein*). Pretendeu-se avaliar a eficácia da lise celular através da sonicação e por pressão, sendo esta avaliação feita por comparação dos extractos celulares obtidos nos diferentes métodos de lise celular, através de electroforese SDS-PAGE. Para além da lise celular, estudou-se também a purificação por cromatografia de afinidade, utilizando resinas de Níquel como sistema de purificação.

1.1 HBP/Soul - família de proteínas que ligam ao grupo Hemo

A biossíntese do grupo Hemo (protoporfirina IX de ferro) ocorre essencialmente nas mitocôndrias dos eritrócitos (~85%) e nos hepatócitos [5]. Este grupo, desempenha um papel fundamental como cofactor proteico em diversos processos celulares tais como transporte de electrões na cadeia respiratória e no transporte de oxigénio no sangue. Para além de cofactor indispensável para o transporte de oxigénio na hemoglobina, o grupo Hemo é um regulador do desenvolvimento dos eritrócitos, sendo este grupo que determina a taxa de síntese proteica bem como o consumo de Ferro para manter os níveis elevados de síntese de hemoglobina [6].

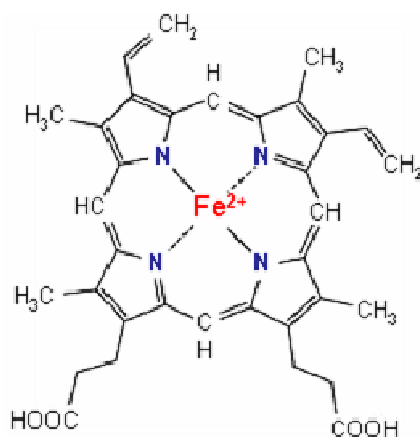


Figura 1. Estrutura do grupo Hemo ou protoporfirina IX- Fe II.

O grupo Hemo e os seus precursores são moléculas hidrofóbicas de baixa solubilidade e reactividade em soluções aquosas. Assim sendo o seu armazenamento e/ou transporte dentro das células será regulado pela formação de complexos entre o Hemo e proteínas ou outras macromoléculas, que funcionem como chaperonas ou possuam função tampão [6]. Têm sido referenciadas algumas proteínas com a capacidade de ligar ao grupo Hemo nomeadamente a GST (glutathione-S-transferase) e HBP23 (*Heme Binding Protein 23 kDa*) [5].

Assim sendo, terá de haver uma estrita regulação da produção de Hemo e dos seus precursores para manter o normal funcionamento celular, sendo que a compreensão do modo de interacção do grupo Hemo com as proteínas, bem como a resolução da estrutura de complexos Hemo-proteína, será fundamental para uma visão completa do papel deste grupo nos sistemas biológicos [5].

Em 1998, a p22HBP, de peso molecular de 22 kDa, foi purificada pela primeira vez a partir do extracto celular de fígado de rato sendo caracterizada como uma proteína citosólica por Taketani *et al* [7]. Posteriormente Blackmon *et al* [5] concluiu que, para além da Hemina, a p22HBP tem a capacidade de se ligar a intermediários da biossíntese do Hemo nomeadamente a Protoporfirina IX e o Coproporfinogénio, embora a sua função permaneça desconhecida [5].

No entanto, um estudo proteômico, envolvendo marcação isotópica com ^{59}Fe nas moléculas de Hemina, de células precursoras dos eritrócitos induzidas para sofrerem diferenciação, demonstraram que a p22HBP é um componente num dos 4 complexos multiproteicos identificados na biossíntese da hemoglobina [8]. Os investigadores sugeriram que a p22HBP pode funcionar como transportadora do grupo Hemo ou como chaperona na inserção do grupo Hemo na hemoglobina, ou ainda como reguladora no transporte do coproporfirinogénio para dentro da mitocôndria [8].

Outros estudos mais recentes sugerem que a p22HBP possivelmente terá influência na infecção e morte celular uma vez terem descoberto que um fragmento acetilado do N-terminal da p22HBP (resíduos 1-21) tem uma função quimioatrativa [9].

Nos humanos, o gene que codifica a p22HBP está localizado no cromossoma 12 e codifica uma proteína com 189 aminoácidos enquanto que nos ratos o gene está localizado no cromossoma 6 e codifica uma proteína de 190 aminoácidos, sendo a homologia entre as duas proteínas de 87% [10].

A p22HBP faz parte de uma família evolutivamente conservada de proteínas de ligação ao grupo Hemo, a família SOUL/HBP, constituída por pelo menos dois membros distintos. A proteína SOUL, que também liga ao Hemo, é expressa na retina e na glândula pineal na galinha doméstica (ckSOUL) e só na retina no caso da forma presente em ratos (mSOUL).

A mSOUL (*murine* SOUL) apresenta 27% de identidade relativamente à sequência da HBP do mesmo organismo. No entanto, enquanto que a HBP é um monómero que aparentemente liga uma molécula de Hemo por subunidade, sem coordenação axial específica do ligando ao Ferro (III), a mSOUL é hexamérica, e liga uma molécula de Hemo por subunidade, com coordenação axial do Ferro (III) à cadeia lateral de uma histidina [11].

hHBP	1	-----MLSMIKNSLFCSVETWPNQVLSKGDKEEVA	YEERACEGCKFATVEWIDKPYDEALREAMPV	61
mHBP	1	-----MLSMIRNSLFCSVETWPNQVLSKGDKEEVS	YEERACEGCKFATVEWIDKPYDEALREAMPV	61
ckSOUL	52	MAEPIQQLIRNNSPQERQSIPTTLIRKEKLDI--LYEKRQY	GKAKWACIKMKERQYEQSICLGFQKL	118
hSOUL	1	MAEPLQDPFAAEDAAQAVETPGUKAPEDACPCPGSYEDRHY	GPAKQVSTSVESMDWDSALQTGFTKL	68
mSOUL	1	MAEPEPDLVAEGSEDQALENPSUKAPEDIDPCPGSYEDRHY	GPAKQVSTSVESLDWDSALQTGFTKL	68
hHBP	62	AKVAGCTNDKEIGMGNTYPISTAFNPED-GSLCKKLK	WVFRIPNQFQSDPPAPSDKSKRIEEREGLTV	129
mHBP	62	MPVVGCTNDKEIGMGNTYPPVSTAFNPED-GSLCKKLK	WVFRIPNQFQSGPPAPSDKSKRIEEREGLTV	129
ckSOUL	119	MRVYCEQMSSELYLGLTIPITIVHTMESQSEMAQAVT	VAYYLPVQLDQPPHPPDSDIIEEWPSTTV	187
hSOUL	69	NSYIQGKMEKEMKIKMTAPVTSYVEPGSGPFS-ESTITIS	SLYIPSEIQFDPPPLESDVIEDRAEMTV	136
mSOUL	69	NGYIQGKMEKEMKIKMTAPVTSYVEPGSGPFS-ESTITIS	SLYIPSEIQFDPPPLESDVIEDRAEMTV	136
hHBP	131	YSMQFGGYAKAEADYVAQATRLRAALEGT-ATYRGDI	YFCTGYDPPMPYGRNEIMLLKT-----	189
mHBP	131	YSTQFGGYAKAEADYVAHATQLRTTLEGT-PATYQGD	VYTCAGYDPPMPYGRNEVVLVKA-----	190
ckSOUL	188	YSRSFRGITTEDSIMREINLLAEIL-ESPELCIDTIF	IAGYTNP-AAANRNEIMFLQRP-----	246
hSOUL	137	FVRSFDGFSQAQKNQEQLTLASILREDGKVFDEKVVY	TAGYNSPVLLNRRNEVULIQKNEPTKENE	205
mSOUL	137	FVRSFDGFSGQKNQEQLTLANILRECKVFNKVFYTAGY	SSPFLLDNRNEVULIQKNEPSVENK	205

Figura 2. Alinhamento da sequência proteica de p22HBP e SOUL de diferentes organismos (hHBP-humana; mHBP- rato; ckSOUL- galinha; hSOUL- humana; mSOUL- rato). A azul-escuro encontram-se os resíduos iguais que se encontram nas diferentes espécies, estando a azul claro os resíduos similares. A vermelho encontra-se delineada a região hidrofóbica envolvida na ligação com o grupo Hemo. O resíduo de Histidina que liga ao Ferro do grupo Hemo na SOUL de rato encontra-se sublinhado a vermelho [7].

A primeira estrutura de uma proteína da família HBP/ SOUL, mHBP, foi determinada em 2006 através de espectroscopia de RMN por Dias *et al* [10]. Esta estrutura consiste num corpo central constituído por 9 folhas β antiparalelas flanqueadas por 2 hélices α (figura 3). Este tipo de conformação sugere uma simetria sugerindo uma duplicação do gene ancestral desta proteína.

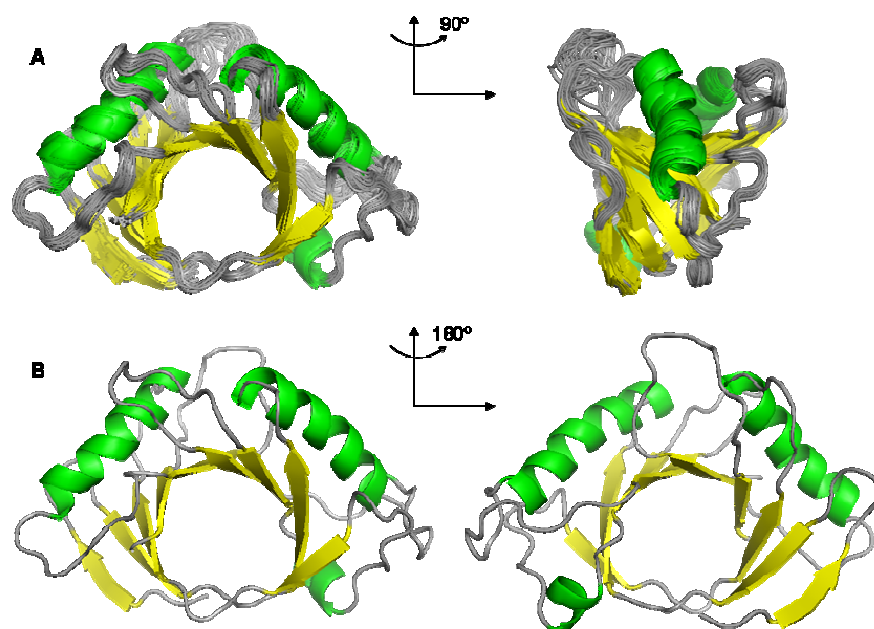


Figura 3. Estrutura de p22HBP de rato resolvida por espectroscopia de RMN. A- vista global da estrutura da p22HBP com rotação a 90°. B- vista com rotação a 180° segundo o eixo dos y evidenciando uma pseudo-simetria [12].

Cada hélice α está disposta com as estruturas folha β da mesma forma, sendo que o subdomínio $\beta_2\text{-}\beta_3\text{-}\alpha_A\text{-}\beta_4\text{-}\beta_5$ (resíduos 21-105) é equivalente ao subdomínio $\beta_6\text{-}\beta_7\text{-}\alpha_B\text{-}\beta_8\text{-}\beta_9$ (resíduos 114-190) [12].

Nos estudos estruturais e funcionais destas proteínas, são utilizados sistemas de sobre-expressão transformados com os vectores que codificam as mesmas, sendo então importante rever como funcionam estes sistemas de sobre-expressão e os métodos de purificação proteica.

1.2 Células hospedeiras – *Escherichia coli*

Actualmente existem vários sistemas para expressão proteica incluindo, entre outros, bactérias, leveduras e células de mamíferos. Cada sistema tem associado vantagens e desvantagens que devem ser tomadas em conta antes da escolha do sistema de expressão a utilizar. A escolha das células hospedeiras vai condicionar não só a expressão da proteína como também o método segundo a qual a mesma vai ser purificada [13].

As bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* não foram só os primeiros microrganismos sujeitos a estudos genéticos e de biologia molecular, mas também os primeiros a serem utilizados pela engenharia genética e expressão de proteínas recombinantes. Começando por ser apenas um modelo utilizado em investigação, rapidamente se transformou num microrganismo industrial, sendo actualmente o sistema de expressão procariota mais utilizado quer a nível de produção de enzimas para diagnóstico ou estudos analíticos como também na produção de proteínas com aplicações farmacêuticas [14].

A bactéria *Escherichia coli* é, por excelência, o principal sistema de expressão in vivo, usado na produção de proteínas recombinantes, devendo-se esta escolha a vantagens tais como: ser de fácil manipulação, ter sido alvo de estudos exaustivos a nível genético e bioquímico, sendo provavelmente o organismo mais bem conhecido, ser de crescimento rápido, em meio simples e económico, e apresentar à disposição um vasto repertório de vectores de clonagem e estirpes hospedeiras mutantes [15].

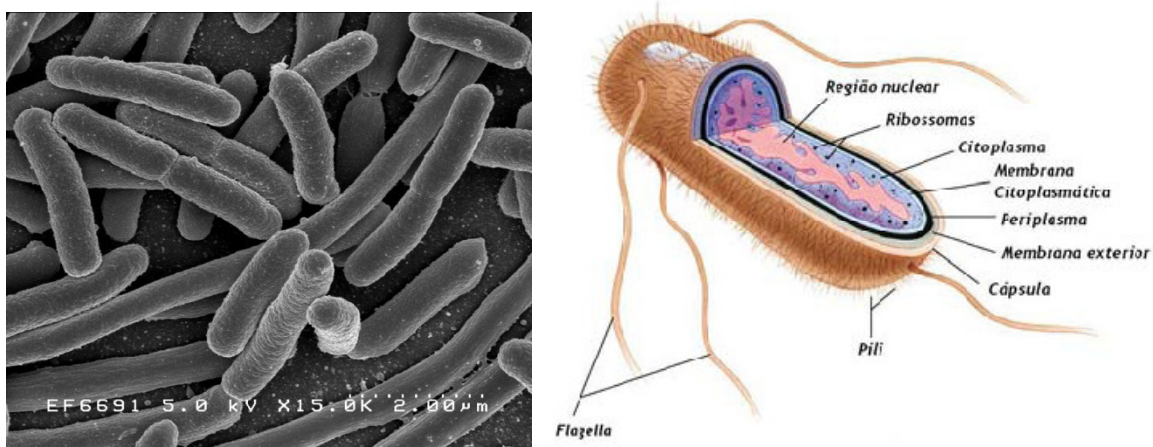


Figura 4. Fotografia de microscopia electrónica de varrimento da *Escherichia coli* (à esquerda) [16], e representação esquemática da estrutura da mesma (à direita) [17].

Em qualquer sistema, a estratégia básica para a expressão de proteínas, passa pela introdução do gene que codifica a proteína num vector de expressão, e a sua transformação no hospedeiro [13]. Este processo será explicado com maior detalhe no capítulo III

1.3 Vectores

A escolha do vector é determinada pelo tamanho do inserto e pela finalidade do processo de clonagem, devendo possuir todos os requisitos necessários para os métodos onde vai ser aplicado, tais como sequenciação, amplificação de DNA, sobre-expressão de proteínas recombinantes. Neste trabalho, os vectores são usados como portadores dos genes que codificam as proteínas em estudo, HBP e SOUL, permitindo assim a sobre-expressão das mesmas.

O vector de expressão nas bactérias são normalmente plasmídeos, embora se possam usar fagos de expressão, nomeadamente na construção de genes. Os plasmídeos são moléculas circulares de cadeia dupla de DNA encontradas separadamente do cromossoma bacteriano e possuem uma origem de replicação própria.

Assim como o DNA cromossomal das células hospedeiras, o DNA plasmídico é duplicado antes da divisão celular. Durante esta divisão, as células filhas herdam DNA plasmídico por forma a assegurar a sua propagação nas gerações sucessivas das células hospedeiras [18].

Os vectores possuem zonas específicas que os caracterizam, destacando-se:

Origem de replicação (*ori*)

A origem de replicação é essencial num vector, para assegurar a sua multiplicação na bactéria. Muitos vectores possuem esta origem derivada do plasmídeo ColE1 da *E. coli*, tais como pBR322-ori ou pUC-ori. Estas sequências, constituídas por cerca de 700 pb permitem uma taxa de amplificação elevada, vectores *high copy*, uma vez que a replicação do vector não depende do cromossoma bacteriano.

Os vectores que possuem uma sequência p15A-ori podem também ser replicados independentemente, sendo a sua taxa de replicação inferior quando comparada com os vectores Col-E1. Este tipo de vectores são mais raros, no entanto permitem a cotransformação de dois plasmídeos diferentes dentro da mesma bactéria por forma a expressar duas proteínas diferentes. Quando dois vectores possuem o mesmo local ori, são incompatíveis uma vez que a bactéria só pode replicar um vector num local ori. No entanto, se se pretender replicar dois vectores na mesma bactéria então estes deverão conter locais ori distintos, tais como Col-E1-ori e p15A-ori.

Existem também os vectores *low-copy* que produzem um determinado número de cópias (entre 1 e 5) dentro da bactéria, em que o seu local de replicação é derivado de plasmídeos F da *E. coli*. Estes vectores são replicados durante a replicação do cromossoma bacteriano [3].

Resistência ao antibiótico

A resistência aos antibióticos é utilizada como marca de selecção nas bactérias transformadas com os vectores. Esta técnica é ideal, pois permite seleccionar os hospedeiros que contêm o vector apenas recorrendo à adição do respectivo antibiótico ao meio de cultura. Os genes mais utilizados na resistência aos antibióticos são Amp^r e Kan^r. O gene Amp^r codifica a enzima β -lactamase, que cliva a ampicilina e penicilina em fragmentos inactivos, destruindo assim a sua capacidade como antibiótico. O uso da ampicilina para a selecção de bactérias transformadas é normalmente um método eficiente. O gene Kan^r codifica uma enzima fosforilante que vai inactivar a kanamicina, um antibiótico mais resistente às elevadas temperaturas do que a ampicilina, sobrevivendo

inclusivamente à autoclavagem. No entanto uma concentração excessiva deste antibiótico, tem efeitos negativos no crescimento de bactérias transformadas [3].

Polylinker

Todos os vectores possuem um número definido de locais de reconhecimento para as enzimas de restrição, que vão cortar o vector num local específico, permitindo a inserção de um fragmento de DNA exógeno, sem que a capacidade de replicação do vector ou a resistência ao antibiótico seja afectada. Estes locais localizam-se próximos uns dos outros, sendo esta zona do vector designada por *polylinker* ou local de clonagem múltipla. Os *polylinkers* compreendem em média 50 a 100 pb, podendo conter cerca de 25 locais únicos de restrição enzimática [3].

Promotor

Para que se inicie o processo de transcrição de um fragmento de DNA na bactéria, é necessário um promotor que assegure a síntese de RNA mensageiro através RNA polimerase. Os mais eficientes são encontrados nos bacteriófagos, tais como os promotores *T5* ou *T7*. Dependendo do promotor, a transcrição é realizada através da RNA polimerase de *E. coli* (*T5*) ou a partir da polimerase de bacteriófagos (*T7*).

A actividade do promotor deve ser estritamente controlada para que não haja problemas na expressão de proteínas recombinantes. A maioria dos promotores encontra-se sob repressão mediada por uma sequência reguladora no operão da lactose da *E. coli*. Através da adição de isopropil β -D-thiogalactosidase (IPTG), o qual vai ligar ao repressor Lac, reduzindo a sua afinidade ao operador Lac, torna-se viável a síntese proteica [3].

A escolha do vector de expressão vai condicionar a estirpe de *E. coli* na qual a proteína recombinante vai ser expressa. Por exemplo, os vectores que usam o promotor *T7* só poderão ser usados em estirpes de *E. coli* que usem a RNA polimerase *T7* na transcrição, como é o caso da estirpe BL21.

1.4 Sobre-expressão

Uma vez escolhida a estirpe bacteriana, esta é então transformada pelo vector apropriado sendo os transformantes seleccionados a partir da resistência ao antibiótico, como se poderá ler em maior detalhe no capítulo III.

O próximo passo corresponde à optimização das condições de sobre-expressão. As bactérias são inoculadas num meio que contem o antibiótico para o qual possuem resistência, ficando em crescimento até atingir a fase exponencial do seu crescimento (figura 5). A densidade óptica a 600 nm é muitas vezes utilizada como indicador do estado de crescimento das células.

No final da fase estacionária, é adicionado um indutor que vai provocar a sobre-expressão da proteína durante a fase estacionária do crescimento. A duração da fase de indução bem como a concentração óptima de indutor são variáveis, recomendando-se que, antes do processo em larga escala, a sobre-expressão seja optimizada em pequena escala [3].

Depois da sobre-expressão, a proteína de interesse terá de ser extraída das células para futura purificação.

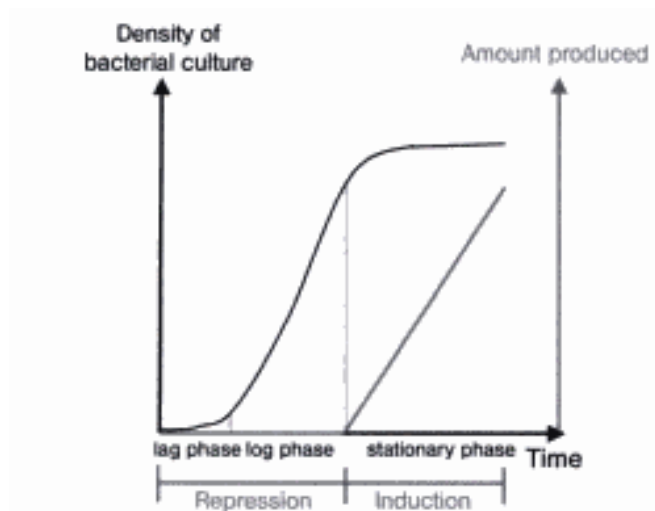


Figura 5. Gráfico representativo do crescimento de uma cultura de *E. coli* e indução proteica. Durante a primeira fase do crescimento (fase lag) e no período exponencial de crescimento celular (fase log), o promotor que regula a expressão da proteína recombinante é mantido sob o controlo de um repressor. A expressão da proteína é estimulada pela adição de um indutor que vai activar o promotor. Se o indutor é adicionado momentos antes da fase estacionária, a expressão proteica aumenta de uma forma constante sem que haja grande alteração na densidade celular [3].

1.5 *Extracto proteico*

O meio a partir do qual são extraídas as proteínas pode ser muito variado, dependendo se a proteína desejada existe naturalmente em solução, como as proteínas do sangue, leite, ou se é necessário produzir um extracto a partir de culturas celulares.

A produção de extractos celulares a partir de leveduras e especialmente bactérias pode ser dividida em dois tipos: lise mecânica e lise não mecânica. Os métodos de lise mecânica usam tensões para destruir a célula, podendo estas tensões serem induzidas por: 1) pressão (uso de *French Press* e homogeneizadores de alta pressão); 2) agitação mecânica (através do uso de misturadores como por exemplo esferas de vidro); 3) ultrasons (recorrendo a processos de sonicação). No caso da lise não mecânica, a destruição das células pode ocorrer por processos físicos (choque osmótico, lise térmica, congelação/descongelação), químicos (uso de detergentes, ácidos/bases ou solventes) ou biológicos/enzimáticos (adição de enzimas exógenas tais como lisozima, glucanases, celulasas que vão digerir os diferentes componentes das paredes celulares). A lise enzimática minimiza os problemas de desnaturação proteica, tornando-se um método eficaz independentemente do volume de cultura existente. No entanto a adição de reagentes como a lisozima ou detergentes poderá influenciar os passos seguintes da purificação proteica.

No caso específico da HBP/SOUL foi comparada a lise celular por sonicação e por alta pressão.

Nos homogeneizadores de alta pressão, coloca-se a suspensão celular sob condições de elevada pressão, sujeitando-as posteriormente a uma redução brusca da mesma. O rebentamento celular é causado pela diminuição brusca da pressão existente. Este método tem a vantagem de manter a suspensão celular, à temperatura desejada, que no caso de proteínas deverá ser de 4°C evitando assim a desnaturação das mesmas.

Na sonicação é colocada uma sonda imersa na suspensão celular, sendo depois aplicados impulsos. Este método provoca o aquecimento exagerado da suspensão, devendo esta ser mantida em gelo durante todo o processo.

Todos os processos de lise celular resultam na formação de um extracto homogéneo na qual se encontra dissolvida a proteína de interesse. Ter-se-á então que remover todos os

componentes insolúveis presentes, sendo a sedimentação por centrifugação o processo mais usual. Obtido o extracto celular, ter-se-á de separar a proteína em questão dos restantes metabolitos celulares presentes [3].

1.6 Métodos de purificação proteica

As proteínas devem ser purificadas antes de serem alvo de estudos estruturais e funcionais. No entanto, dada a variedade de tamanho, carga, e solubilidade que as proteínas apresentam, não pode existir um único método de purificação para todas as proteínas.

Qualquer molécula quer seja proteína, glícido ou ácido nucleico, pode ser separada de outras tendo por base as diferenças numa ou mais propriedades físicas ou químicas. Quanto maior o número de diferenças entre duas proteínas, mais fácil e eficiente será a sua separação. As características mais usadas para a purificação proteica são a carga, polaridade, o tamanho, definido pela massa ou comprimento e a afinidade de ligação a ligandos específicos [18].

A cromatografia de troca iónica é uma das técnicas utilizadas quando se pretende separar as proteínas segundo a sua carga. A superfície das proteínas possui determinada carga devido à presença de cadeias laterais de certos aminoácidos (aspartato, glutamato, histidina, lisina e arginina). Esta característica permite que a proteína se ligue a uma matriz de carga oposta. Por exemplo, quando uma solução proteica é aplicada numa coluna carregada positivamente, só as proteínas com carga negativa vão aderir à matriz da coluna, sendo as restantes eluídas (figura 6). As proteínas que ficaram retidas são posteriormente eluídas através da aplicação de um gradiente de concentração crescente de sais. Estes sais vão competir com a proteína pelas cargas positivas da matriz, fazendo com que, a determinada concentração de sais, a proteína seja eluída ao longo da coluna [3].

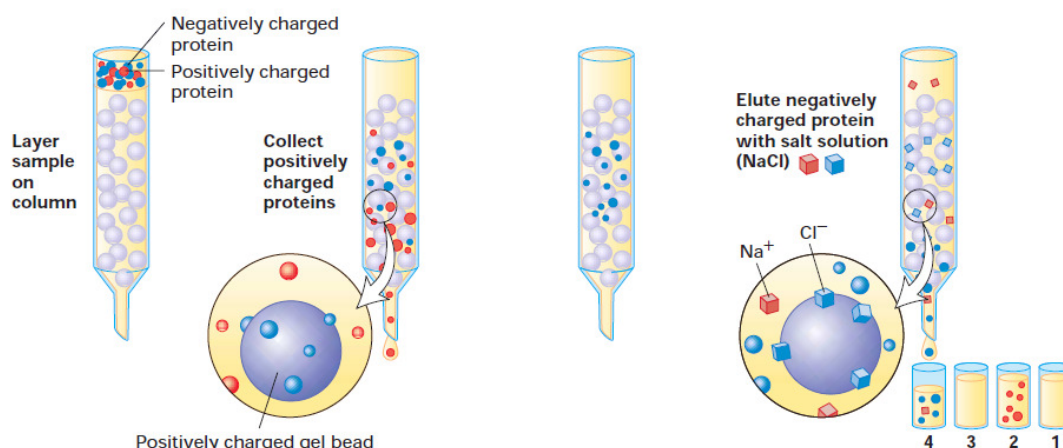


Figura 6. Esquema representativo da cromatografia por troca iônica [18].

As proteínas que diferem segundo a sua massa, podem ser separadas pela cromatografia de exclusão molecular também conhecida por cromatografia de filtração em gel. Neste método a coluna é constituída por uma matriz de pequenas esferas porosas empacotadas. Ao fazer passar a solução de proteínas pela matriz da coluna, as proteínas de menor dimensão vão preencher os poros das esferas demorando mais tempo a eluir ao longo da coluna. As proteínas maiores, vão eluir mais rapidamente uma vez que o seu tamanho impede-as de ficarem retidas nesses mesmos poros [3].

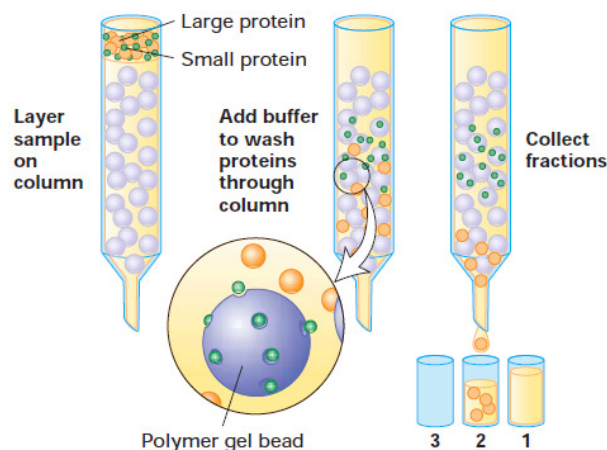


Figura 7. Esquema da cromatografia de exclusão molecular [18].

A capacidade que as proteínas têm de se ligar especificamente a outras moléculas é o princípio em que se baseia outro método de purificação, a cromatografia de afinidade. A cromatografia de afinidade, desenvolvida durante a década de 60 e 70, baseia-se no uso de um ligando imobilizado que interactua de forma específica com a proteína desejada. Este ligando é imobilizado numa matriz adequada que possa ser empacotada em coluna.

A amostra que contém a proteína que se pretende purificar é então aplicada na coluna, ficando esta retida na matriz enquanto que as proteínas indesejadas são eluídas ao longo da coluna [14]. No caso da figura 8 está representado um tipo de cromatografia de afinidade em que o ligando é um anticorpo específico para a proteína em estudo.

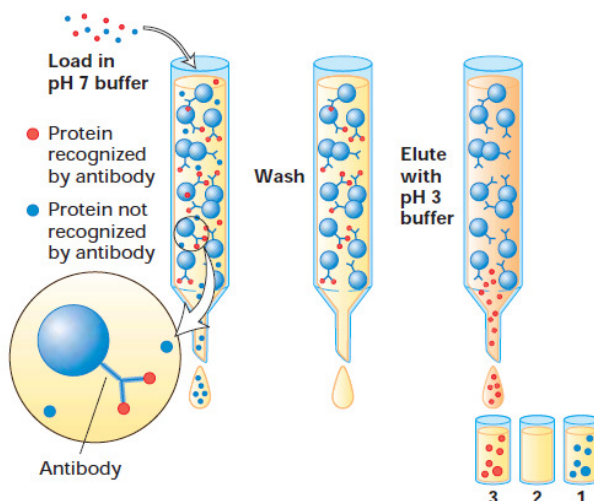


Figura 8. Representação da cromatografia de afinidade em que os agentes quelantes são anticorpos específicos da proteína em estudo [18].

No entanto existem outras estratégias na cromatografia de afinidade que passam pela fusão de *tags* ao N- ou C- terminal de proteínas heterólogas permitindo assim um melhoramento a nível de expressão, solubilidade, estabilidade, detecção e principalmente purificação. Existem diversos tipos de marcadores de afinidade que permitem simplificar a purificação proteica, estando a sua escolha dependente de diversos factores [4].

O marcador mais comum, *His-tag*, consiste numa cadeia de 4 a 10 resíduos de Histidina que vai permitir que a proteína seja purificada através de cromatografia de afinidade. Este marcador pode ser utilizado em qualquer sistema de expressão proteica e confere à proteína uma grande afinidade com a coluna cromatográfica, que contém na sua matriz agentes quelantes de Níquel, permitindo assim uma purificação mais eficiente.

Ao ser aplicada na coluna de afinidade, a proteína marcada com a cauda de histidinas irá encontrar agentes quelantes, nomeadamente o Níquel, que a vão reter na coluna (figura 9). A desadsorção da proteína à coluna pode ser feita especificamente pela adição de um agente que compete com as histidinas pela espécie quelante, ou pode ser feita de uma forma não específica pela alteração do pH, força iónica ou polaridade [13].

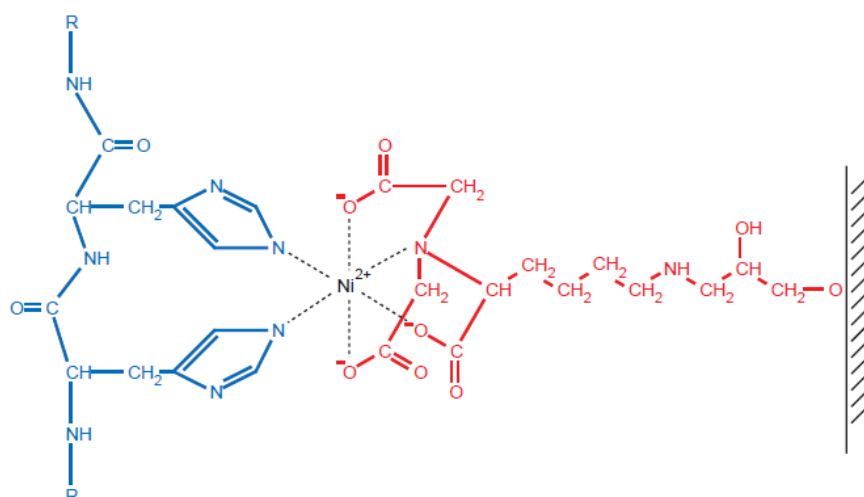


Figura 9. Interação entre os resíduos de Histidina da *His-tag* (a azul) e a resina Ni-NTA, Níquel-Ácido nitrilotriacético (a vermelho) usada na cromatografia por afinidade [4].

Na figura 10 pode-se observar, de uma forma genérica, as várias etapas na purificação por cromatografia de afinidade, sendo os extractos obtidos analisados por espectroscopia de UV. Numa primeira fase a coluna é equilibrada com uma solução tampão, sendo de seguida aplicada a solução que contem a proteína. A proteína vai ser adsorvida e os restantes metabolitos presentes na solução são eluídos, sendo que o extracto resultante desta etapa terá uma absorvância elevada. Quando a proteína é eluída ao longo da coluna, através do uso de um tampão de eluição adequado, verifica-se um pico na absorvância a 280 nm [19].

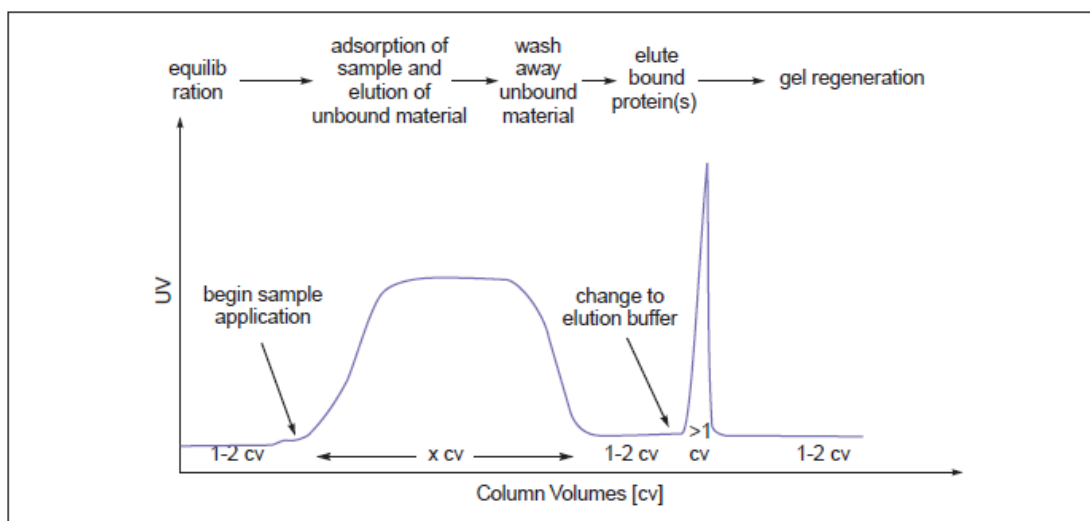


Figura 10. Gráfico de absorvância de extractos genéricos obtidos por cromatografia de afinidade [19].

O imidazole compete com os resíduos de histidina para se ligar ao Níquel nas colunas de cromatografia de afinidade. A concentração de imidazole necessária para eluir a proteína ao longo da coluna, de forma a obter o melhor grau de purificação possível depende do tipo de proteína, sendo este parâmetro objecto de estudo neste trabalho. Para que o imidazole não interfira posteriormente na quantificação proteica, nomeadamente na leitura de absorvância a 280 nm é recomendado utilizar imidazole com elevado grau de pureza ou então aplicar a solução que contem a proteína pura numa coluna dessalting. [13].

A concentração de imizadole em cada passo deve ser optimizada para assegurar o maior grau de purificação possível (ausência de proteínas indesejáveis) e elevada concentração conseguida através da ligação eficiente das proteínas com a cauda de histidinas [19].

1.7 Análise da purificação proteica – electroforese em gel

As proteínas, quando em solução aquosa, possuem determinada carga qualquer que seja o pH da solução, excepto quando este é igual ao seu ponto isoeléctrico. Esta propriedade permite às proteínas migrarem quando expostas a um campo eléctrico, sendo este o princípio da electroforese de proteínas. A electroforese em gel é mais apropriada do que em solução, uma vez que a electroforese em gel diminui a difusão das proteínas, formando-se bandas nítidas isoladas permitindo assim uma análise mais eficiente. A separação das bandas é feita numa matriz cujos poros poderão possuir diferentes tamanhos consoante o tamanho da proteína em estudo. O tamanho dos poros bem como das proteínas em estudo, vão condicionar a viscosidade do meio, sendo as proteínas separadas quer pela sua carga quer pelo seu tamanho. [3]

Os géis mais utilizados possuem uma matriz de poliacrilamida, podendo estes ser divididos em dois grupos: géis desnaturantes SDS-PAGE e géis nativos.

Na electroforese SDS-PAGE (*Sodium Dodecil Sulfate–Poliacrilamide Gel Electrophoresis*) as proteínas são previamente tratadas com o detergente Dodecil-sulfato de sódio (SDS), provocando a sua desnaturação. Proteínas oligoméricas são divididas em cadeias polipeptídicas individuais enquanto que as pontes dissulfureto, responsáveis pela estrutura terciária das proteínas, são reduzidas pela adição de 2-mercaptoetanol [19].

O SDS vai-se ligar fortemente às proteínas em proporção com o número de aminoácidos que as constituem, sendo que as cadeias polipeptídicas vão possuir uma molécula de SDS por cada dois aminoácidos. Cada molécula de SDS possui uma carga negativa, sendo que uma cadeia polipeptídica com 180 aminoácidos (massa aproximadamente 20 kDa) vai-se complexar com 90 moléculas de SDS, ficando com igual número de cargas negativas. O elevado número de cargas negativas atribuídas pelo SDS, vai fazer com que a razão massa/carga seja virtualmente a mesma para todas as proteínas. Assim sendo a separação das proteínas ao longo do gel, está quase exclusivamente dependente do tamanho das cadeias polipeptídicas [3].

Assim, as proteínas aplicadas no gel migram através da matriz do gel na direcção do ânodo (pólo positivo). Proteínas de menor massa molecular migram mais facilmente através da rede formada pela poliacrilamida e, por essa razão, têm maior mobilidade do que proteínas de maior massa molecular [20].

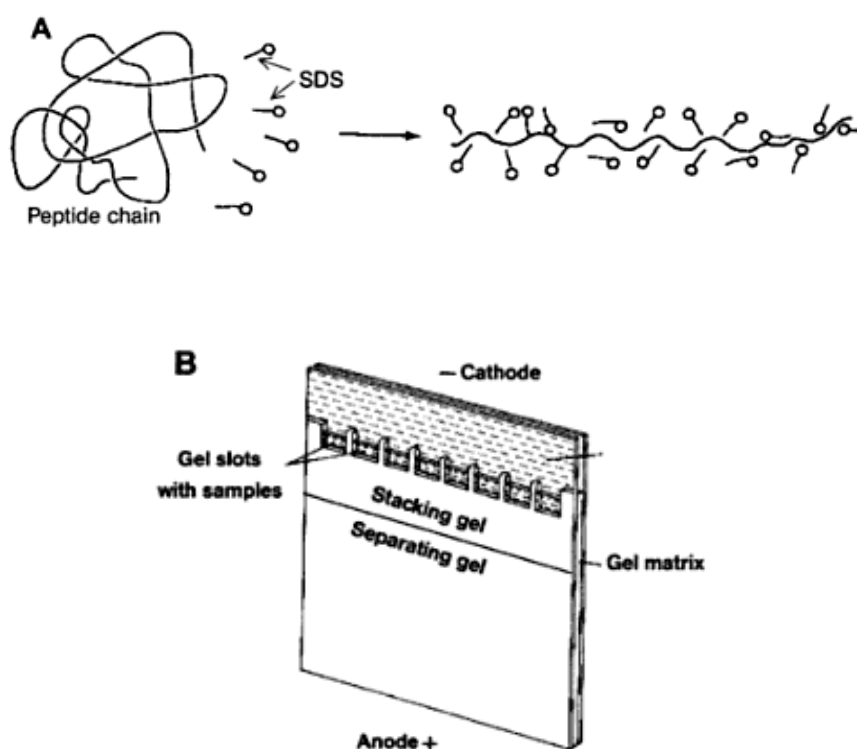


Figura 11. SDS-PAGE: A- efeito desnaturalizante do SDS; B- esquema de uma cassete de SDS-PAGE [3].

Para aumentar a resolução de um gel SDS-PAGE é usado um sistema descontínuo, em que se pode distinguir o gel de empacotamento (*stacking gel*) formado sobre um gel de separação (*running* ou *separating gel*) que se situa na parte inferior da cassette (figura 11).

Quanto maior a concentração de acrilamida no gel, menor será o tamanho dos poros do gel. Assim sendo, para separar proteínas de massa molecular inferior, utilizam-se géis de acrilamida 15%, enquanto que proteínas de elevada massa molecular devem ser separadas por géis com 7.5 % de acrilamida.

A grande desvantagem dos géis SDS-PAGE está relacionada com a desnaturação proteica, o que implica a perda de actividade enzimática que é irreversível na maioria dos casos. No entanto é um método extremamente adequado para avaliar a eficiência de um processo de purificação, sendo essa a aplicação deste tipo de géis no presente estudo.

Os géis nativos separam as proteínas na sua conformação nativa. Para isso a amostra e as soluções tampão utilizadas não podem conter agentes que provoquem a desnaturação proteica tais como a ureia e SDS. O tampão de corrida utilizado, possui pH ligeiramente alcalino (pH 8-9) o que vai conferir à maioria das proteínas uma carga negativa permitindo-lhes assim migrar na direcção do pólo positivo, ânodo. No entanto, as proteínas que possuam carga positiva nestas condições, não vão entrar no gel, difundindo-se no meio na direcção do pólo negativo, cátodo, sendo uma desvantagem deste tipo de géis. Por outro lado, a grande vantagem deste método é que as proteínas analisadas e extraídas de géis nativos, não são desnaturadas podendo ser posteriormente utilizadas em estudos enzimáticos ou outros que envolvam proteínas no seu estado nativo [3].

Uma vez terminada a electroforese, o gel terá de ser analisado para retirar informação sobre a posição de cada proteína e a respectiva quantificação. Uma vez que a maioria das proteínas não visíveis directamente, o gel terá de ser processado para determinar a localização das diferentes bandas isoladas. O processo mais utilizado para a visualização das bandas é a coloração, sendo as colorações mais usuais as de prata ou *Coomassie Blue*. Estes corantes diferem entre si na sensibilidade e na habilidade que têm de fixar as proteínas. [20].

A coloração Coomassie Blue é baseada na ligação não específica deste corante a todas as proteínas presentes no gel. Apesar deste sistema de coloração ser menos sensível do que a coloração de prata, é largamente utilizado por ser mais conveniente. O gel é mergulhado numa solução contendo o corante; sendo que o corante em excesso será libertado na fase de descoloração em que se remove o corante não ligado às proteínas. As proteínas são detectadas como bandas azuis quando vistas contra um fundo branco [20].

A coloração de prata é o método mais sensível sendo no entanto uma coloração irreversível das proteínas em géis de poliacrilamida. Esta sensibilidade, no entanto, torna-se dispendiosa uma vez que este método é muito susceptível se sofrer a interferência de factores externos ao gel. Assim sendo deverão ser usados reagentes de elevada qualidade, os tempos deverão ser rigorosamente respeitados e a limpeza é essencial para a reprodutibilidade dos resultados. A coloração do gel é feita através da impregnação de iões de prata solúveis, sendo posteriormente tratado com formaldeído, o que vai reduzir os iões de prata e formar um precipitado castanho insolúvel de metais. Esta redução é promovida pela proteína [20].

Após a coloração do gel, este poderá ser digitalizado ou seco, para posteriormente se analisar a posição e intensidade de cada banda que representará determinada proteína. Para além disso as bandas poderão ser quantificadas quando comparadas com marcadores de referência que são eluídos no próprio gel.

Os marcadores proteicos, são constituídos por um conjunto de bandas de peso molecular conhecido, sendo usados para calcular as massas moleculares de cada banda. O logaritmo da massa molecular de uma proteína é proporcional à distância que esta migrou no gel. Assim sendo, o primeiro passo é desenhar uma curva através das distâncias percorridas pelas bandas do marcador que possuem peso molecular conhecido. Traçada esta curva standard, medindo a distância percorrida por uma determinada banda é possível estimar o seu peso molecular.

A electroforese em gel, nomeadamente SDS-PAGE, torna-se assim uma ferramenta bastante útil para avaliar a eficiência de um método de purificação proteica. Neste capítulo propõe-se a optimização da purificação das proteínas HBP e SOUL, sendo a metodologia utilizada descrita em seguida.

2 Material e métodos

2.1 Estirpes e plasmídeos

A sobre-expressão de SOUL foi alcançada usando células BL21 (DE3), células essas transformadas com o plasmídeo hSOUL/IOH3379-pDEST17-D18 (RZPD) (ver anexo 1) que contem a sequência que codifica a proteína SOUL agregada a uma *tag* de Histidinas.

10	20	30	40	50	60
MSYYHHHHH	LESTSLYKKA	GTMAEPLQPD	PGAAEDAAAQ	AVETPGWKAP	EDAGPQPGSY
70	80	90	100	110	120
EIRHYGPAKW	VSTSVESMDW	DSAIQTGFTK	LNSYIQGKNE	KEMKIKMTAP	VTSYVEPGSG
130	140	150	160	170	180
PFSESTITIS	LYIPSEQQFD	PPRPLESDVF	IEDRAEMTVF	VRSFDGFSFA	QKNQEQLLTL
190	200	210	220		
ASILREDGKV	FDEKVYYTAG	YNSPVKLLNR	NNEVWLIQKN	EPTKENE	

Figura 12. Sequência que codifica a proteína hSOUL. A amarelo encontra-se assinalada a cauda de histidinas, no N terminal, usada como *tag* e a cinzento a sequência nativa da proteína.

A sobre-expressão da mHBP foi alcançada usando células BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pNJ2 (ver anexo 1).

10	20	30	40	50	60
MKQSTHHHHH	HNSLFGSVET	WPWQVLSTGG	KEDVSYEERA	CEGGKFATVE	VTDKPVDEAL
70	80	90	100	110	120
REAMPKIMKY	VGGTNDKGVG	MGMTVPVSFA	VFPNEDGSLQ	KKLKVWFRIP	NQFQGSPAP
130	140	150	160	170	180
SDESVKIEER	EGITVYSTQF	GGYAKEADYV	AHATQLRTTL	EGTPATYQGD	VYYCAGYDPP
190					
MKPYGRRNEV	WLVKA				

Figura 13. Sequência que codifica a mHBP. A amarelo encontra-se assinalada a cauda de histidinas, no N terminal, usada como *tag* e a cinzento a sequência nativa da proteína.

2.2 Armazenamento das estirpes bacterianas

As estirpes foram mantidas a 4 °C em placas de LB-Agar contendo Zeocina 25 mg/mL no caso da SOUL e Ampicilina 50 mg/mL no caso da HBP, durante cerca de 4 semanas. Para armazenamentos superiores a 4 semanas, foram preparados stocks de glicerol (500 µL cultura + 500 µL glicerol estéril, 80 % v/v). Estes stocks foram mantidos a – 80 °C.

2.3 Sobre-expressão e purificação da SOUL

A optimização da sobre-expressão e purificação da SOUL teve por base uma metodologia citada por Dias, J.S. (2007) [12].

Pré-inóculo

As culturas de *E. coli* para a subsequente sobre-expressão proteica foram crescidas em 20 mL de meio Luria-Bertani, meio LB, previamente autoclavado, com agitação de 200 rpm, a 37°C, durante 12 a 16 horas.

O meio LB foi suplementado com o respectivo antibiótico, Zeocina numa concentração final de 25 µg/ mL.

Inóculo

O pré-inóculo obtido foi adicionado a 1L de meio mínimo M9, previamente autoclavado, cuja composição se encontra descrita na tabela 1.

Meio mínimo M9 (1 L)	Solução sais M9 (1 L)
950 mL H ₂ O	128 g Na ₂ HPO ₄
50 mL solução sais M9	30 g KH ₂ PO ₄
	5 g NaCl
	10 g NH ₄ Cl

Tabela 1. Composição do meio mínimo M9.

Antes da inoculação, foi adicionado ao meio mínimo M9:

- 0,5 mL MgSO_4 1M (autoclavado ou filtrado)
- 0,5 mL CaCl_2 0.1M (autoclavado ou filtrado)
- 10 mL glucose 20% (filtrado) ou 4g de glucose
- 0,25 mL tiamina-HCl 0,2% (filtrado)
- 0,5 mL $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1M (filtrado, preparada na hora de usar)
- 0,5 mL Zeocina 25mg/mL.

Após inoculação, incubou-se a cultura a 37°C com agitação de 200 rpm, até se obter uma densidade óptica entre 0,6 e 0,8. A leitura da densidade óptica (OD) a um comprimento de onda de 595 nm corresponde a uma estimativa da densidade celular. Quando $\text{OD}_{595} = 1$ então significa que temos aproximadamente 1×10^9 células de *E. coli* por mL de cultura.

Quando se atingiu a densidade óptica desejada, adicionou-se à cultura o indutor de expressão proteica, IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) numa concentração final de 0,1 mM. A cultura é então incubada a 30 °C com agitação de 200 rpm durante 12 a 16 horas.

O IPTG é um indutor da transcrição genética que induz a enzima T7 RNA polimerase, a qual se liga ao promotor T7, iniciando a transcrição do DNA complementar de interesse

Após o crescimento as células são recolhidas por centrifugação a 8000 rpm, centrífuga Eppendorf 5804R, durante 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, rejeitou-se o sobrenadante, sendo o *pellet* ressuscitado em tampão 50 mM de fosfatos, 300 mM NaCl, pH 8,0.

2.4 Estudo da sonicação versus alta pressão

A sonicação foi um dos métodos usados na lise celular, com o intuito de obter um extracto proteico solúvel a partir do *pellet* de *E. coli*, obtido anteriormente, ressuscitado em 60 mL de tampão 50 mM fosfato, 300 mM NaCl.

A sonda de ultrasons é mergulhada na ressuspensão celular e são aplicadas vibrações através do sonicador Sonics-Vibra Cell. O extracto celular deve ser mantido em gelo uma vez que ocorre um aumento da temperatura.

Para se avaliar qual a melhor combinação de tempo de sonicação, executaram-se duas combinações diferentes de sonicação: Dividiu-se a amostra em 3 volumes iguais (20 mL), sendo dois deles sujeitos a sonicação de:

- 6 x 2 minutos, intervalos 1 min.
- 12 x 1 minuto, intervalos 1 min.

Os restantes 20 mL foram aplicados num homogeneizador de alta pressão, EmulsiFLEX C3, da *Avestin*. Fez-se passar água destilada pelo sistema do homogeneizador, provocando simultaneamente um aumento progressivo na pressão no interior do sistema, através do fecho das válvulas próprias para o efeito até se atingir os 1000 psi. Quando se atingiu esta pressão, o sistema foi equilibrado com tampão fosfato 50 mM, 300 mM NaCl. Após a passagem da solução tampão, aplicou-se a amostra, submetendo-a a 3 passagens pela *EmulsiFlex*.

Os extractos obtidos dos diferentes ensaios de lise celular, foram posteriormente centrifugados a 20 000 rpm, centrífuga Beckman coulter, rotor JA 25-50, durante 60 min., a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante obtido foi aplicado numa coluna de afinidade Ni-NTA, sendo depois aplicado o gradiente de imidazole.

2.5 *Estudo do gradiente de imidazole*

Para avaliar qual o melhor gradiente de imidazole a utilizar a fim de se obter uma fracção que contivesse a SOUL o mais pura possível, foram então preparadas soluções de 50 mM tampão fosfatos, 300 mM NaCl, pH 8,0 contendo as seguintes concentrações de imidazole:

- 0 mM imidazole
- 10 mM imidazole
- 20 mM imidazole
- 50 mM imidazole
- 75 mM imidazole
- 175 mM imidazole
- 500 mM imidazole

A resina de Ni-NTA (QIAGEN), foi inicialmente equilibrada com solução tampão 50 mM fosfatos, 300 mM NaCl, pH 8,0. O extracto celular foi então aplicado na coluna e de seguida foi aplicado o gradiente de imidazole referido no parágrafo anterior. Os volumes aplicados (15 mL) correspondem a 2 vezes o volume da coluna. As fracções obtidas foram recolhidas e o seu grau de purificação foi avaliado através de electroforese SDS-PAGE.

2.6 SDS-PAGE

Para a análise dos extractos através de SDS-PAGE utilizou-se o sistema Mini-Protean 3 cell da BioRad, e como marcador de pesos moleculares utilizou-se o marcador para baixos pesos moleculares da *Amesharm Biosciences*.

Primeiro, preparou-se o *running* gel 15% segundo a tabela 2 deixando-se polimerizar durante cerca de 1 hora. Posteriormente preparou-se o *stacking* gel (tabela 2) e aplicou-se na cassette, por cima do *running* gel.

<i>Running 15%</i>		<i>Stacking 4%</i>	
H₂O	1,7 mL	H₂O	2,9 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	1,25 mL
Acrilamida 40 %	3,7 mL	Acrilamida 40 %	500 µL
Bis-acrilamida 2 %	2,0 mL	Bis-acrilamida 2 %	250 µL
SDS 10 %	100 µL	SDS 10 %	50 µL
APS 10%	50 µL	APS 10%	25 µL
Temed	5 µL	Temed	5 µL

Tabela 2. Composição do *running* gel 15% e do *stacking* gel 4% para SDS-PAGE.

As amostras antes de serem aplicadas foram tratadas com uma solução desnaturante:

- 200 µL SDS 10 %
- 125 µL Tris 6,8
- 100 µL Mercaptoetanol
- 75 µL glicerol
- Azul de bromofenol

Foi retirada uma alíquota de 50 μ L de cada amostra e adicionada 50 μ L da solução desnaturante a cada uma delas. Esta combinação foi fervida durante 5 minutos.

Posteriormente foi aplicado 10 μ L de amostra tratada em cada poço do gel, sendo este depois submetido a uma corrente constante de 200 V durante aproximadamente 90 minutos.

Revelação com Coomassie blue

Os géis, depois de terminada a electroforese, foram corados por um corante não específico, o azul de Coomassie (0,1% Coomassie em 50% metanol, 7% ácido acético), por imersão durante cerca de 1 hora com agitação moderada. Findo este tempo, o gel foi lavado com água destilada e de seguida imerso numa solução descorante (40% ácido acético+ 10% etanol).

2.7 Concentração

A fracção onde se encontra a proteína a purificar, correspondente à concentração de imidazole de 75 mM, foi concentrada através de centricons de 10 kDa, usando tampão fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0 para proceder a algumas lavagens. O volume final obtido deverá ser aproximadamente 2,5 mL, uma vez que é este o volume de solução proteica que se deve aplicar na coluna dessalting. A amostra é então aplicada numa coluna *dessalting*, previamente equilibrada com 20 mL de solução tampão fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0. O que elui na coluna, após a aplicação da amostra, é rejeitado. A proteína vai eluir com a aplicação de 3,5 mL do mesmo tampão com que foi equilibrada a coluna, sendo este o volume final obtido de proteína.

2.8 Sobre-expressão e purificação da HBP

Após a optimização da sobre-expressão e purificação da Soul, verificou-se se as optimizações feitas eram extensíveis à sobre-expressão e purificação da HBP.

Pré-inóculo

Partindo de uma colónia de *E.coli*, inoculou-se 20 mL de meio LB, previamente autoclavado, com agitação de 200 rpm, a 37°C, durante 12 a 16 horas.

O meio LB foi suplementado com o respectivo antibiótico, ampicilina numa concentração final de 50 µg/ mL.

Inóculo

O pré-inóculo obtido foi adicionado a 1L de meio MOPS, previamente autoclavado, cuja composição se encontra descrita na tabela 2.

Meio MOPS
745 mL H ₂ O
200 mL solução M (ver anexo 3)

Tabela 2. Composição do meio MOPS.

Antes da inoculação, foi adicionado ao meio MOPS:

- 1 mL ampicilina 50mg/mL
- 1 mL solução O (ver anexo 3)
- 100 µL solução P (ver anexo 3)
- 1 mL solução S (ver anexo 3)
- 0,5 mL vitamina B1(Tiamina/HCl) 0,2%
- 20 mL glucose 20% (ou 4g)
- 10 mL NaHCO₃ 1M

Após inoculação, incubou-se a cultura a 30°C com agitação de 200 rpm durante 12 a 16 horas, até se obter uma densidade óptica entre 0,6 e 0,8.

Após o crescimento as células foram recolhidas por centrifugação a 8000 rpm, centrífuga *Eppendorf 5804R*, durante 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, rejeitou-se o sobrenadante, sendo o *pellet* ressuscitado em tampão 50 mM de fosfatos, 300 mM NaCl, pH 8,0.

A lise celular foi conseguida através da passagem das células pela *EmulsiFlex*, mantendo este equipamento a 4°C. O extracto obtido foi mantido em gelo e posteriormente centrifugado a 20 000 rpm, centrífuga *Beckman coulter*, durante 60 min., a 4°C.

Finalizada a centrifugação conservou-se o sobrenadante a 4°C e rejeitou-se o *pellet*, guardando apenas uma pequena alíquota para aplicar no gel SDS-PAGE. O sobrenadante foi então aplicado na resina de Ni-NTA equilibrada com tampão 50 mM fosfatos, 300 mM NaCl, pH 8,0.

Posteriormente foi aplicado o gradiente de imidazole usado também para purificar a SOUL:

10 mM imidazole, 20 mM imidazole, 50 mM imidazole, 3 volumes 75 mM imidazole, 175 mM imidazole e 500 mM imidazole.

Para avaliar o grau de purificação, os vários extractos correspondentes às diferentes concentrações de imidazole foram aplicados num gel SDS-PAGE, em condições desnaturantes como descrito anteriormente para o caso da SOUL.

2.9 Quantificação

A concentração da proteína purificada foi determinada através da aplicação da Lei de Beer-Lambert (equação 1) em que a absorvância é directamente proporcional à concentração.

$$Abs = \varepsilon \times l \times c$$

Equação 1. Lei de Beer-Lambert, em que ε corresponde absorbtividade molar ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$), l , largura da célula (cm) e c a concentração da proteína (M).

O valor de absorbtividade molar para a mHBP, a 280 nm, é de $36900 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$, sendo no caso da SOUL de $38390 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ tal como referenciado por Dias, J.S em 2006 [10].

3 Resultados

3.1 Estudo da sonicação versus alta pressão

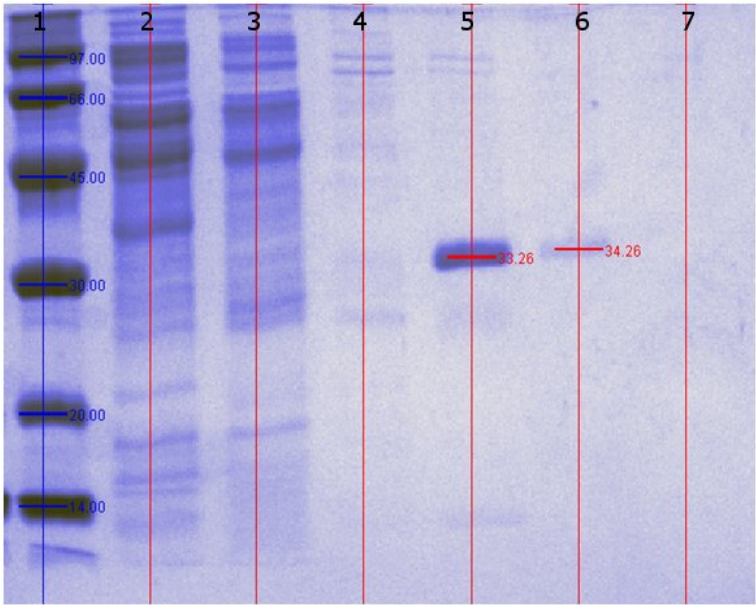


Figura 14. Gel SDS-PAGE dos extractos obtidos, na purificação da SOUL, usando a alta pressão para a lise celular. 1: Marcador; 2: Fracção 10 mM; 3: Fracção 20 mM; 4: Fracção 50 mM; 5: Fracção 75 mM; 6: Fracção 175 mM; 7: Fracção 500 mM.

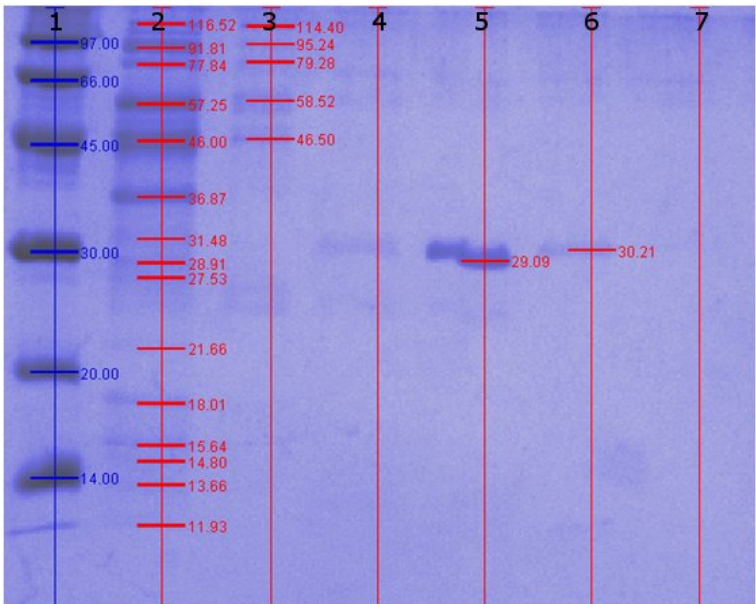


Figura 15. Gel SDS-PAGE dos extractos obtidos, na purificação da SOUL, usando a sonicação, (6x2 min.) para a lise celular. 1: Marcador; 2: Fracção 10 mM; 3: Fracção 20 mM; 4: Fracção 50 mM; 5: Fracção 75 mM; 6: Fracção 175 mM; 7: Fracção 500 mM.

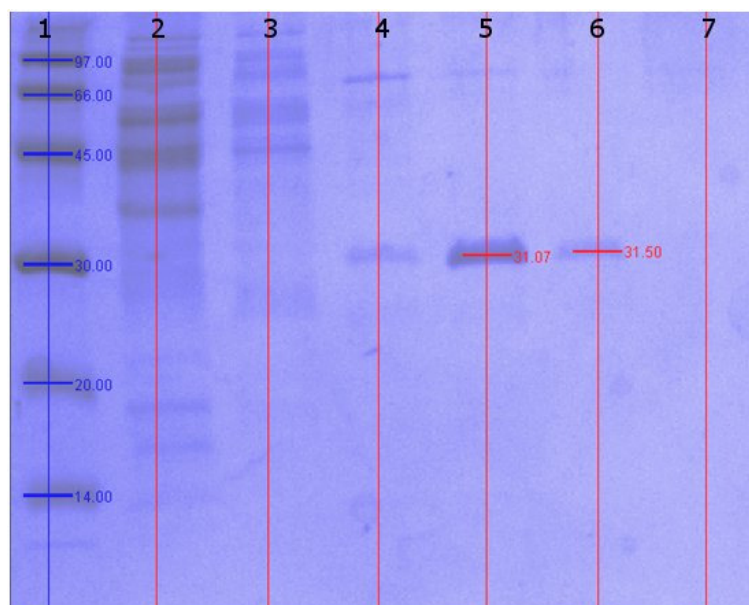


Figura 16. Gel SDS-PAGE dos extractos obtidos, na purificação da SOUL, usando a sonicação, (12x1 min.). 1: Marcador; 2: Fracção 10 mM; 3: Fracção 20 mM; 4: Fracção 50 mM; 5: Fracção 75 mM; 6: Fracção 175 mM; 7: Fracção 500 mM.

3.2 Estudo do gradiente de imidazole

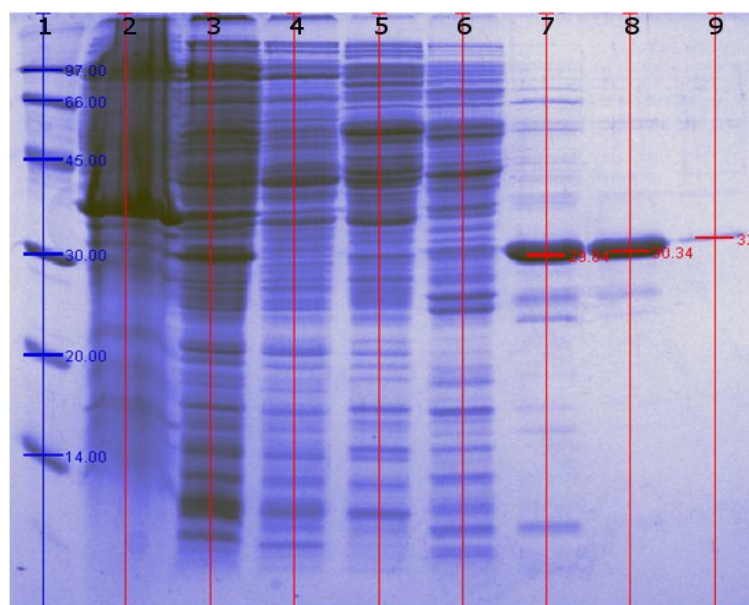


Figura 17. Gel SDS-PAGE obtido no estudo do gradiente de imidazole, na purificação da proteína SOUL. 1: Marcador; 2: *Pellet*; 3: Fracção 0 mM; 4: Fracção 10 mM; 5: Fracção 20 mM; 6: Fracção 50 mM; 7: Fracção 75 mM; 8: Fracção 175 mM; 9: Fracção 500 mM.

No estudo do gradiente de imidazole a usar para otimizar o processo de purificação, tendo em conta a figura 14, pode-se verificar que o volume de solução de imidazole 75 mM aplicado não foi suficiente para eluir toda a proteína, sendo esta eluída na fracção seguinte – 175 mM.

Repetiu-se a sobre-expressão e aplicou-se um maior volume da fracção de 75 mM de imidazole (25 mL) para garantir que toda a proteína seja eluída nesta fracção. Como se pode verificar na figura 15, embora ainda permaneça uma quantidade residual de proteína na fracção de 175 mM a maioria da proteína foi eluída na fracção de 75 mM.

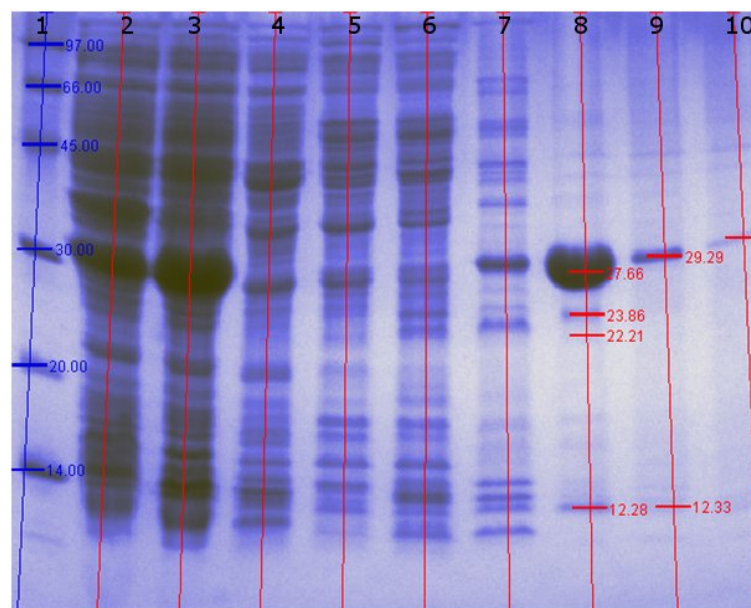


Figura 18. Gel SDS-PAGE obtido no estudo do gradiente de imidazole, na purificação da proteína SOUL.1: Marcador; 2: extracto celular; 3: extracto após eluição na resina; 4: Fracção 0 mM; 5: Fracção 10 mM; 6: Fracção 20 mM; 7: Fracção 50 mM; 8: Fracção 75 mM; 9: Fracção 175 mM; 10: Fracção 500 mM.

3.3 Sobre-expressão e purificação da HBP

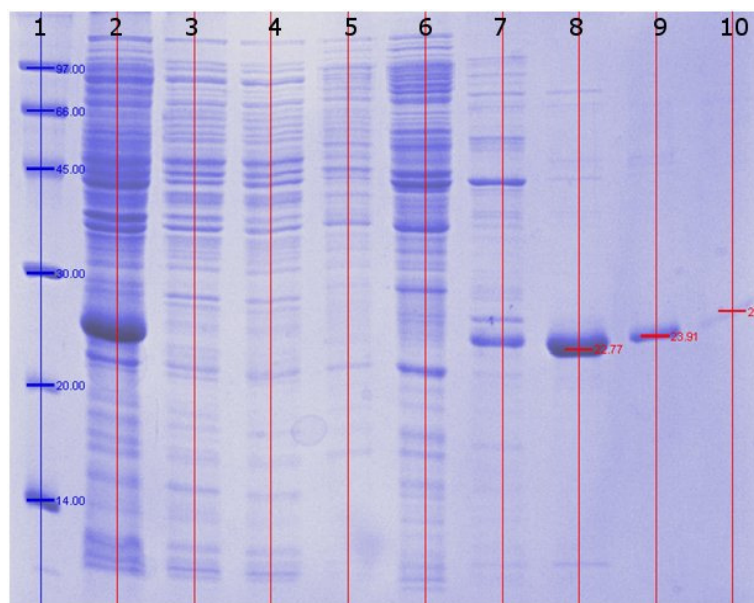


Figura 19. Gel SDS-PAGE obtido na purificação da HBP. 1: Marcador; 2: extracto celular; 3: extracto após eluição na resina; 4: Fracção 0 mM; 5: Fracção 10 mM; 6: Fracção 20 mM; 7: Fracção 50 mM; 8: Fracção 75 mM; 9: Fracção 175 mM; 10: Fracção 500mM.

Após optimização do protocolo para sobre-expressão e purificação da SOUL, usou-se o mesmo método de lise celular e o mesmo gradiente de imidazole para verificar se estes também seriam os ideais para a purificação da HBP. Pela figura 19, podemos verificar que a HBP, tal como a SOUL, também elui maioritariamente na fracção 75 mM de imidazole embora tenha eluído uma quantidade residual na fracção 175 mM.

3.4 Quantificação

As proteínas HBP e SOUL foram quantificadas através da leitura das absorvâncias a 280 nm, e posterior aplicação da lei Beer-Lambert (equação 1). O gráfico da figura 20 representa um espectro de absorvância da HBP, a partir do qual se poderá extrair o valor da absorvância a 280 nm.

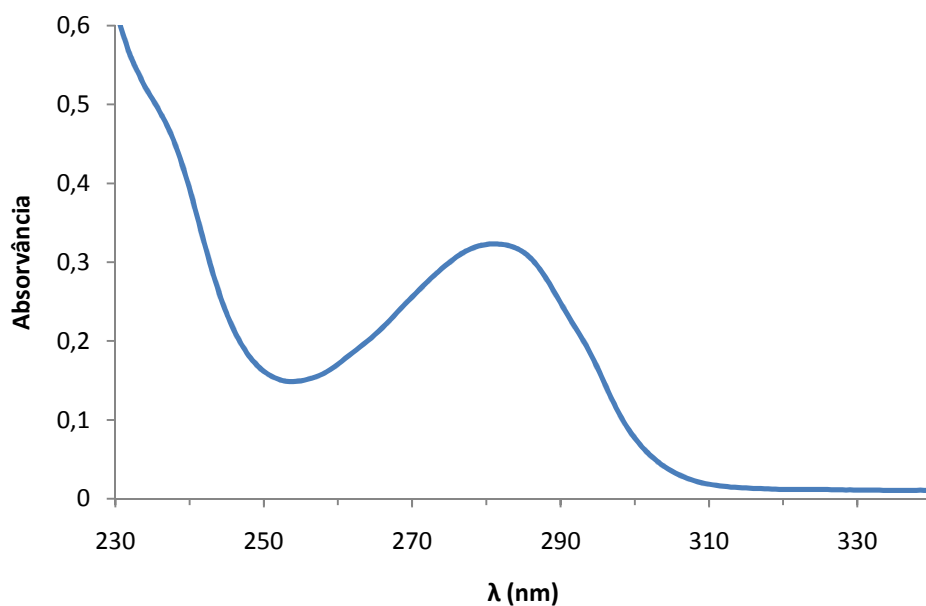


Figura 20. Espectro de absorvância da mHBP, diluída 1:25, entre 230 e 340 nm de comprimento de onda (λ).

Através da leitura do gráfico, verifica-se que a absorvância a 280 nm é de 0,32. Sabendo que o valor de ϵ para a mHBP, a 280 nm, é de $36900 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $l = 1 \text{ cm}$, e que a amostra se encontra diluída 1:25:

$$Abs = c \times \epsilon \times l \times \text{factor diluição} \leftrightarrow c = \frac{0,32}{(36900 \times 1 \times 1/25)} \leftrightarrow c = 0,22 \text{ mM}$$

Sabendo que o volume final de mHBP é de 3,5 mL (após a passagem na coluna *dessalting*), pode-se estimar a quantidade de proteína produzida por litro de cultura inoculado. Assim sendo, e tomando como exemplo, a amostra do gráfico da figura 20:

$$c = n/v \leftrightarrow n = 0,22 \times 10^{-3} \times 3,5 \times 10^{-3} \leftrightarrow n = 7,7 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

Em termos de massa, pode-se afirmar que, a partir de um litro de cultura de *E.coli*, foi possível sobreexpressar 17 mg de mHBP.

4 Discussão dos resultados

No estudo do melhor método para lise celular, pode-se constatar que não existe grande diferença entre os extractos obtidos pela sonicação (figuras 15 e 16). No que respeita à lise celular através de alta pressão, pode-se verificar que a quantidade de SOUL presente na fracção de 75 mM é maior, sugerindo uma lise celular mais eficiente (figura 14).

Se compararmos as bandas dos géis respeitantes às fracções de 10 e 20 mM, para os três ensaios de lise celular, podemos verificar que nas fracções, obtidas a partir da *EmulsiFlex*, existe um maior número de bandas, quando comparado com as fracções obtidas por sonicação. Este facto indica também uma maior eficácia da lise celular através da *EmulsiFlex* uma vez se obter extractos proteicos mais ricos, sugerindo uma maior libertação das proteínas dos espaços intracelulares.

A lise celular através da sonicação não sendo tão eficaz, não permite uma completa libertação das proteínas intracelulares, havendo maior perda de proteína. Para além disso, durante a lise celular por sonicação verifica-se um aumento acentuado da temperatura, o que poderá desnaturar a proteína. O uso da pressão como método de lise celular, para além de ser mais eficiente, mantém o extracto celular à temperatura desejada, 4 °C, evitando assim a desnaturação da proteína.

Analisando os géis SDS obtidos no estudo do gradiente de imidazole poder-se-á indicar um gradiente como sendo o ideal para obter o maior grau de purificação da proteína sem que haja grandes perdas da mesma: 0, 10, 20, 50, 75, 175, 500 mM de imidazole em tampão 50 mM fosfatos, 300 mM NaCl, pH 8,0.

Capítulo II – Extinção de fluorescência

1 Introdução

O objectivo deste capítulo é o estudo da extinção de fluorescência da mHBP e seus variantes, através da determinação das constantes de dissociação, no sentido de avaliar a interacção destas proteínas com os compostos tetrapirrólicos, Hemina e Protoporfirina IX.

A espectroscopia de fluorescência tem sido uma técnica muito desenvolvida na última década sendo uma fonte de informação muito importante no que respeita aos sistemas químicos e bioquímicos. Actualmente esta técnica é usada nas mais diversas áreas da ciência nomeadamente em biotecnologia, diagnóstico clínico, sequenciação de DNA; genética forense, microscopia de fluorescência, entre outras. Actualmente existe um desenvolvimento contínuo de testes baseados no fenómeno de fluorescência como é o caso do teste imunoenzimático ELISA que permite a detecção de anticorpos específicos no plasma sanguíneo [21].

Apesar da evolução nas aplicações da fluorescência, bem como o constante melhoramento da instrumentação e tecnologia, os princípios segundo os quais se baseia este fenómeno permanecem os mesmos [21].

A fluorescência é um caso particular de luminescência, sendo esta última definida como a emissão de luz por uma espécie, a partir de estados electrónicos excitados. A luminescência é formalmente dividida em duas categorias: a fluorescência e a fosforescência, dependendo esta classificação da natureza do estado excitado.

Na fluorescência, o electrão na orbital do estado excitado é par, com spin oposto, ao segundo electrão na orbital do estado fundamental, sendo designado por estado excitado singuleto. Consequentemente o regresso ao estado fundamental é permitido pelo spin e ocorre rapidamente através da emissão de um fotão. As taxas de emissão são normalmente de 10^8 s^{-1} , sendo o tempo médio de fluorescência aproximadamente 10 ns.

A fosforescência corresponde à emissão de luz de um estado excitado tripleto, em que o electrão no estado excitado tem o mesmo momento de spin que o electrão no estado fundamental. As transições para o estado fundamental ocorrem mais lentamente (10^3 a 10^0 s^{-1}) sendo o tempo médio de fosforescência de milissegundos a segundos. [22]

O fenómeno de fluorescência

Na fluorescência existe excitação de uma espécie através da absorção de radiação visível ou ultravioleta (UV), ficando esta mesma espécie num estado electrónico excitado. A energia remanescente é emitida como fótons com comprimento de onda maior que o absorvido, regressando a espécie ao seu estado fundamental. [22].

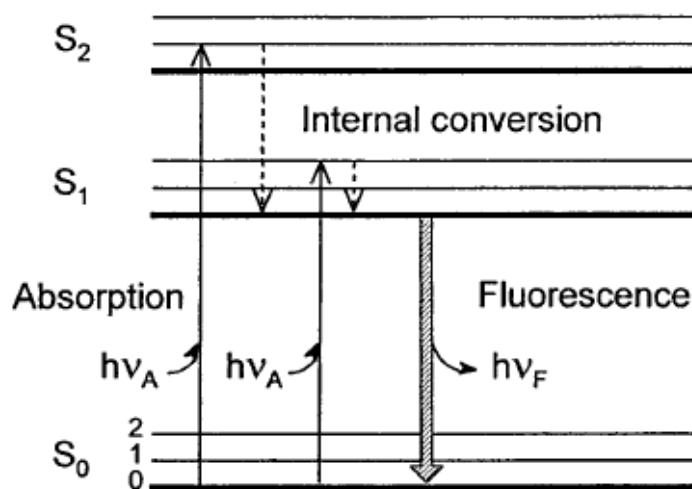


Figura 21. Diagrama de Jablonski [23].

Estas transições de energia podem ser representadas com a ajuda do diagrama de energia de Jablonski (figura 21). Um estado electrónico excitado (S₁ ou S₂) é observado quando um electrão, localizado na orbital molecular ocupada de mais alta energia de um estado electrónico fundamental (S₀), passa para a próxima orbital de maior energia desocupada. A excitação geralmente é acompanhada por mudanças no estado vibracional da molécula. Inicialmente ocorre relaxação do estado excitado para um nível vibracional mais baixo (*internal conversation*), sendo seguida pela fluorescência, ou seja, o relaxamento da espécie para o estado fundamental acompanhado pela emissão de radiação. A eficiência de emissão é definida pelo rendimento quântico (Φ) que corresponde à razão entre os fótons emitidos e fótons absorvidos na totalidade [23] .

Extinção de fluorescência

A extinção de fluorescência (*fluorescence quenching*) refere-se a um processo que diminui a intensidade da emissão de fluorescência de uma amostra. Existem dois tipos de extinção de fluorescência: dinâmica (colisional) ou estática, em que qualquer um deles implica, obrigatoriamente, a existência de contacto entre o fluoróforo, composto que emite fluorescência, e o agente de extinção [21].

Esta técnica tem sido amplamente estudada quer pelo fenómeno em si mas também por constituir uma importante fonte de informação dos sistemas bioquímicos. As aplicações bioquímicas estão relacionadas com as interacções moleculares que ocorrem aquando da extinção da fluorescência.

A extinção de fluorescência dinâmica consiste na desactivação de fluorescência do estado excitado por colisão do fluoróforo com o agente de extinção durante o tempo de vida do estado excitado. Geralmente, após o contacto entre ambos, o fluoróforo regressa ao estado fundamental, sem emissão de um fotão e sem qualquer alteração química das moléculas envolvidas. Na extinção de fluorescência estática, existe a formação de um complexo, não fluorescente, entre o fluoróforo e o agente de extinção [21].

Quer para a extinção de fluorescência estática quer para a dinâmica, tem que haver o contacto entre o fluoróforo e o agente de extinção, sendo este requisito do contacto molecular o responsável pela vasta aplicação desta técnica aos sistemas bioquímicos. Por exemplo, esta técnica pode revelar a acessibilidade dos fluoróforos aos agentes de extinção. Considerando um fluoróforo ligado a uma proteína ou a uma membrana; se a proteína ou a membrana forem impermeáveis ao agente de extinção e o fluoróforo estiver dentro da macromolécula, então não poderão ocorrer fenómenos de extinção de fluorescência quer colisional quer estática. Por este motivo esta técnica pode ser usada para estudar a localização dos fluoróforos nas proteínas e nas membranas bem como avaliar a permeabilidade das membranas em relação aos agentes de extinção.

Agentes de extinção de fluorescência

São vários os iões e moléculas com capacidade para actuar como agentes de extinção de fluorescência, entre os quais se encontram o oxigénio molecular (que extingue a fluorescência de praticamente todos os fluoróforos conhecidos), a acrilamida, o ião iodeto ou brometo.

Uma vez que existe uma extensa variedade de substâncias que podem actuar como agentes extintores de fluorescência, é comum a indicação de combinações agentes de extinção-fluoróforo, pois nem todos os fluoróforos sofrem extinção pelos agentes existentes. É importante referir que a extinção de fluorescência depende do processo de extinção envolvido que, por sua vez, depende das propriedades químicas das moléculas (fluoróforo e agente de extinção).

No caso da extinção de fluorescência em estruturas organizadas, como em membranas ou proteínas, convém mencionar que a extinção vai depender da acessibilidade dos agentes de extinção ao fluoróforo. [21]

Extinção de fluorescência nas proteínas

As proteínas contêm três aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) que contribuem para a sua fluorescência intrínseca, sendo a fluorescência total da proteína um somatório das contribuições individuais destes aminoácidos. No entanto, a maior parte da emissão é consequência da excitação dos resíduos de triptofano, uma vez que estes resíduos possuem maior fluorescência e maior rendimento quântico em relação aos outros aminoácidos aromáticos. Para além disso a intensidade, rendimento quântico e comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência do triptofano está dependente do solvente e meio químico envolvente. [12]

Esta fluorescência intrínseca é geralmente usada como ferramenta em estudos estruturais de proteínas uma vez que permite determinar as diferentes acessibilidades dos triptofanos ao agente de extinção. Para além disso esta propriedade poderá também ser usada para avaliar a afinidade com que os agentes de extinção se ligam à proteína. [12]

Relativamente a este trabalho, a extinção de fluorescência foi utilizada para avaliar o grau de afinidade entre a HBP e os compostos tetrapirrólicos Hemina e Protoporfirina IX. A formação de complexos Hemina-p22HBP são bastante importantes tendo em conta a sua possível função como tampão. [5]

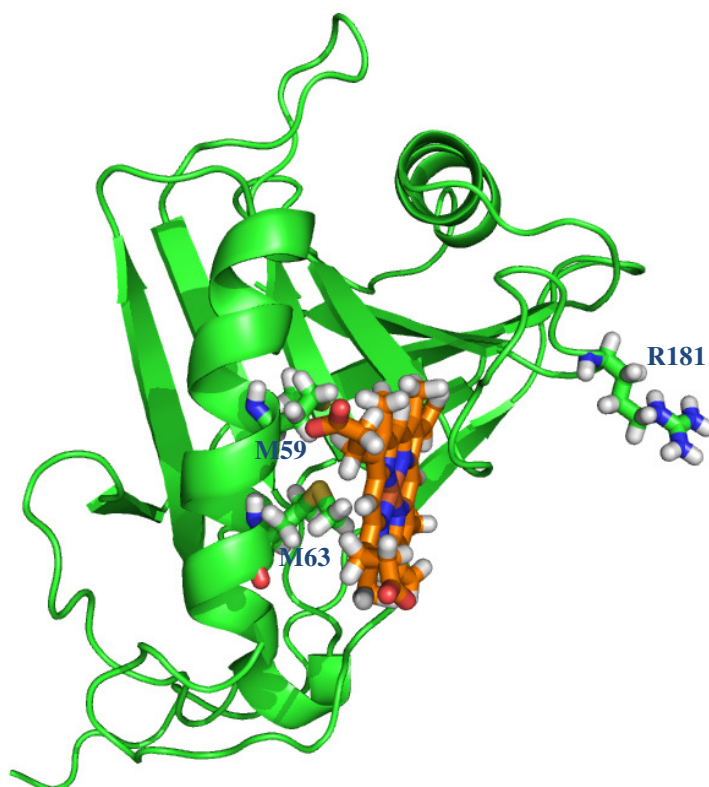


Figura 22. Estrutura 3D representativa do complexo mHBP (verde) - hemina (laranja), onde se encontram evidenciados os resíduos M59, M63 e R181.

Pretende-se assim determinar as constantes de dissociação (K_d) para os mutantes M59S, M63S e R181A uma vez que estes resíduos se localizam na região de ligação, que poderá estar envolvida na interacção com os grupos tetrapirrólicos (figura 22). Com estes mutantes pretende-se alterar a polaridade no centro (OH mais polar) nos locais de interacção e verificar qual o efeito da alteração dessa polaridade. Esta alteração, permite estudar a interacção dos grupos ácidos do grupo Hemo com os grupos polares dos resíduos intervenientes na ligação ao Hemo.

2 Material e métodos

2.1 *Preparação da amostra*

As amostras de p22 HBP usadas na extinção de fluorescência foram preparadas a partir da diluição de uma solução stock de 0,22 mM, com solução tampão fosfato 50 mM, pH 8,0, sendo a concentração da solução stock de proteína estimada através da espectroscopia de UV, usando um coeficiente de extinção molar a 280 nm (ϵ_{280}) de $36900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Na preparação das soluções tetrapirrólicas, a Hemina e PPIX foram dissolvidas em amónia e posteriormente dissolvidas em água. A estas soluções foi adicionado um surfactante Tween 80 com uma concentração final de 1,5 % (v/v) e o pH foi ajustado a 8,0 através da adição de KH_2PO_4 , 1M. Estas soluções stock foram diluídas em tampão fosfato 50 mM de forma a obter uma concentração final de $1,5 \mu\text{M}$.

2.2 *Leituras*

Na extinção de fluorescência foram adicionadas aliquotas de PPIX ou Hemina, de volume crescente, segundo a tabela 3, a 1 mL de solução de HBP 100 nM. Após cada adição a mistura foi cuidadosamente homogeneizada e deixada em repouso durante 1 minuto.

Os espectros de emissão de fluorescência foram adquiridos num espectrómetro *Shimadzu UV-2501PC*. Foram realizados 3 *scans* no intervalo de comprimentos de onda de emissão de 320 e 400nm, sendo depois registado a média dos 3 *scans*. O comprimento de onda de excitação de 279nm, fendas de excitação/emissão de 5,5nm.

3 Resultados

3.1 Espectros de emissão

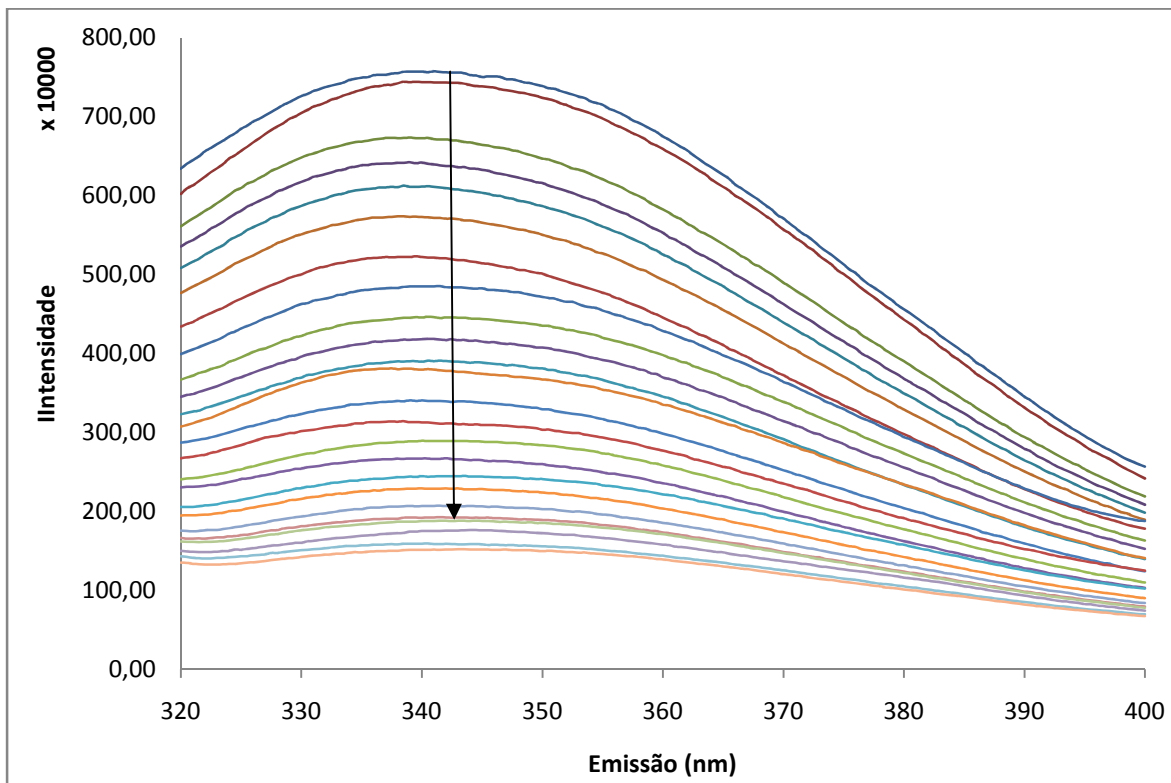


Figura 23. Espectro de emissão em extinção de fluorescência da M59S, na presença de PPIX como agente de extinção.

Analisando o gráfico da figura 23 onde se exemplifica um espectro de emissão para a extinção de fluorescência da M59S, pode-se verificar que à medida que se vai adicionando PPIX a fluorescência vai diminuindo gradualmente até que se atinge um equilíbrio em que a extinção de fluorescência é máxima.

3.2 Determinação da Constante de Dissociação

	Intensidade (340nm)	V _{Hemina} ad. (L)	V _{Hemina} ad. total(L)	f.dil.	Int.(340nm) (corr)	n _{adic.} /mol	[Hemina] _{cel} /M	[hbp] _{cel} /M	Normalização Int.340nm
HBP-01	2,51E+06	0,00E+00	0,00E+00	1,0000	2,51E+06	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-07	1,00E+00
HBP-02	2,21E+06	2,00E-06	2,00E-06	1,0010	2,21E+06	3,08E-12	1,54E-09	9,99E-08	8,38E-01
HBP-03	1,99E+06	2,00E-06	4,00E-06	1,0020	1,99E+06	6,16E-12	3,07E-09	9,98E-08	7,22E-01
HBP-04	1,79E+06	4,00E-06	8,00E-06	1,0040	1,79E+06	1,23E-11	6,14E-09	9,96E-08	6,16E-01
HBP-05	1,60E+06	4,00E-06	1,20E-05	1,0060	1,61E+06	1,85E-11	9,18E-09	9,94E-08	5,19E-01
HBP-06	1,37E+06	8,00E-06	2,00E-05	1,0100	1,38E+06	3,08E-11	1,52E-08	9,90E-08	3,95E-01
HBP-07	1,22E+06	8,00E-06	2,80E-05	1,0140	1,24E+06	4,31E-11	2,13E-08	9,86E-08	3,19E-01
HBP-08	1,11E+06	1,00E-05	3,80E-05	1,0190	1,13E+06	5,85E-11	2,87E-08	9,81E-08	2,62E-01
HBP-09	1,03E+06	1,00E-05	4,80E-05	1,0240	1,05E+06	7,39E-11	3,61E-08	9,77E-08	2,20E-01
HBP-10	9,42E+05	1,50E-05	6,30E-05	1,0315	9,72E+05	9,70E-11	4,70E-08	9,69E-08	1,77E-01
HBP-11	8,88E+05	1,50E-05	7,80E-05	1,0390	9,22E+05	1,20E-10	5,78E-08	9,62E-08	1,50E-01
HBP-12	8,37E+05	2,00E-05	9,80E-05	1,0490	8,78E+05	1,51E-10	7,19E-08	9,53E-08	1,26E-01
HBP-13	7,97E+05	2,00E-05	1,18E-04	1,0590	8,44E+05	1,82E-10	8,58E-08	9,44E-08	1,08E-01
HBP-14	7,46E+05	3,00E-05	1,48E-04	1,0740	8,01E+05	2,28E-10	1,06E-07	9,31E-08	8,55E-02
HBP-15	6,81E+05	3,00E-05	1,78E-04	1,0890	7,41E+05	2,74E-10	1,26E-07	9,18E-08	5,36E-02
HBP-16	6,28E+05	4,00E-05	2,18E-04	1,1090	6,96E+05	3,36E-10	1,51E-07	9,02E-08	2,94E-02
HBP-17	6,09E+05	4,00E-05	2,58E-04	1,1290	6,87E+05	3,97E-10	1,76E-07	8,86E-08	2,46E-02
HBP-18	5,76E+05	5,00E-05	3,08E-04	1,1540	6,65E+05	4,74E-10	2,06E-07	8,67E-08	1,27E-02
HBP-19	5,44E+05	5,00E-05	3,58E-04	1,1790	6,41E+05	5,51E-10	2,34E-07	8,48E-08	0,00E+00
HBP-20	5,27E+05	1,00E-04	4,58E-04	1,2290	6,47E+05	7,05E-10	2,87E-07	8,14E-08	3,31E-03

Tabela 3. Valores obtidos para a extinção de fluorescência da mHBP na presença de Hemina, para uma concentração inicial de mHBP de 100 nM, e uma solução de Hemina de 1.54 µM.

A partir dos valores de intensidade de emissão obtidos, calculou-se a intensidade corrigida (coluna 6, tabela 3), multiplicando a intensidade obtida (coluna 2) pelo factor de diluição (coluna 5). O factor de diluição por sua vez foi determinado a partir da razão entre o volume total presente na célula (mHBP+Hemina) e o volume inicial na célula (2 mL de HBP 100 nM).

A concentração de Hemina na célula (coluna 8) foi determinada a partir da razão entre o número de moles de Hemina em solução (coluna 7) e o volume total na célula [volume de

mHBP (2 mL) + volume total de Hemina adicionada (coluna 4)]. Na coluna 9 encontra-se a concentração de HBP corrigida, uma vez que o volume na célula vai aumentando à medida que se adiciona Hemina.

Este tratamento de dados foi também realizado para as restantes leituras de extinção de fluorescência dos variantes de mHBP, nomeadamente M59S, M63S e R181A, com a Hemina, bem como para a extinção de fluorescência com a PPIX.

A partir dos valores da concentração de hemina e PPIX na célula e dos valores normalizados da intensidade corrigida, para a mHBP e respectivos mutantes, traçaram-se os gráficos das figuras 24 e 25 respectivamente.

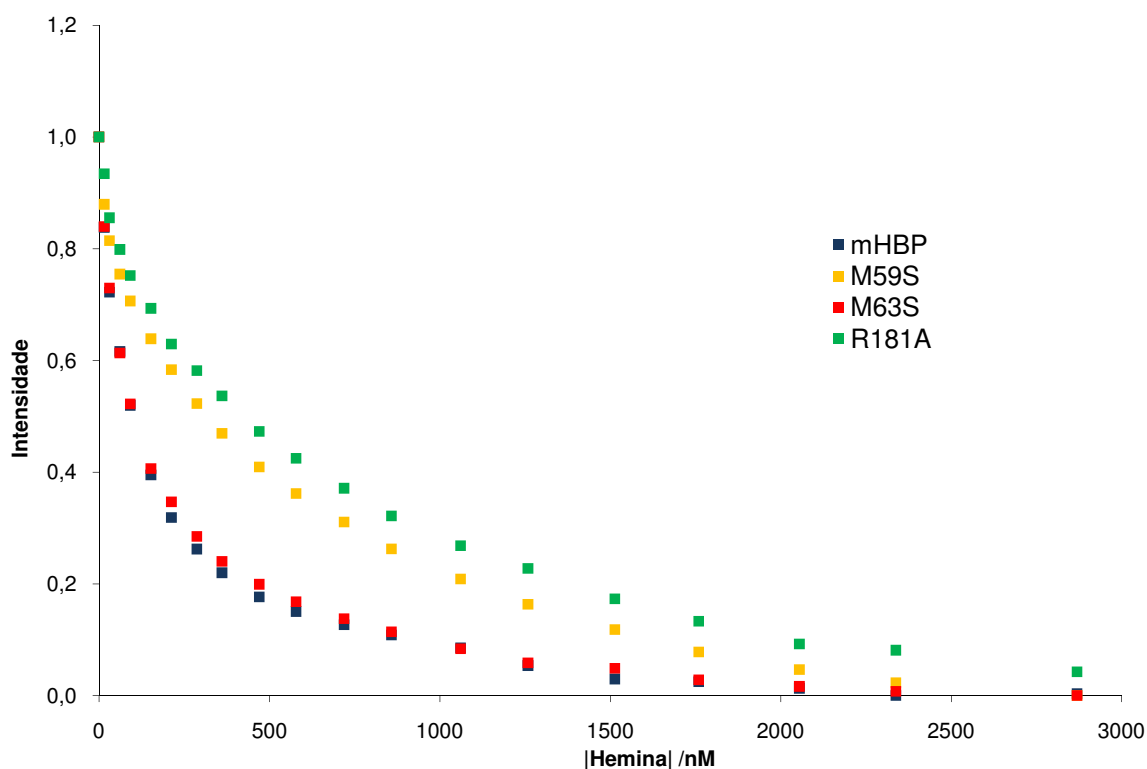


Figura 24. Gráfico que relaciona a intensidade de fluorescência da mHBP e respectivos variantes, com a concentração de Hemina em solução.

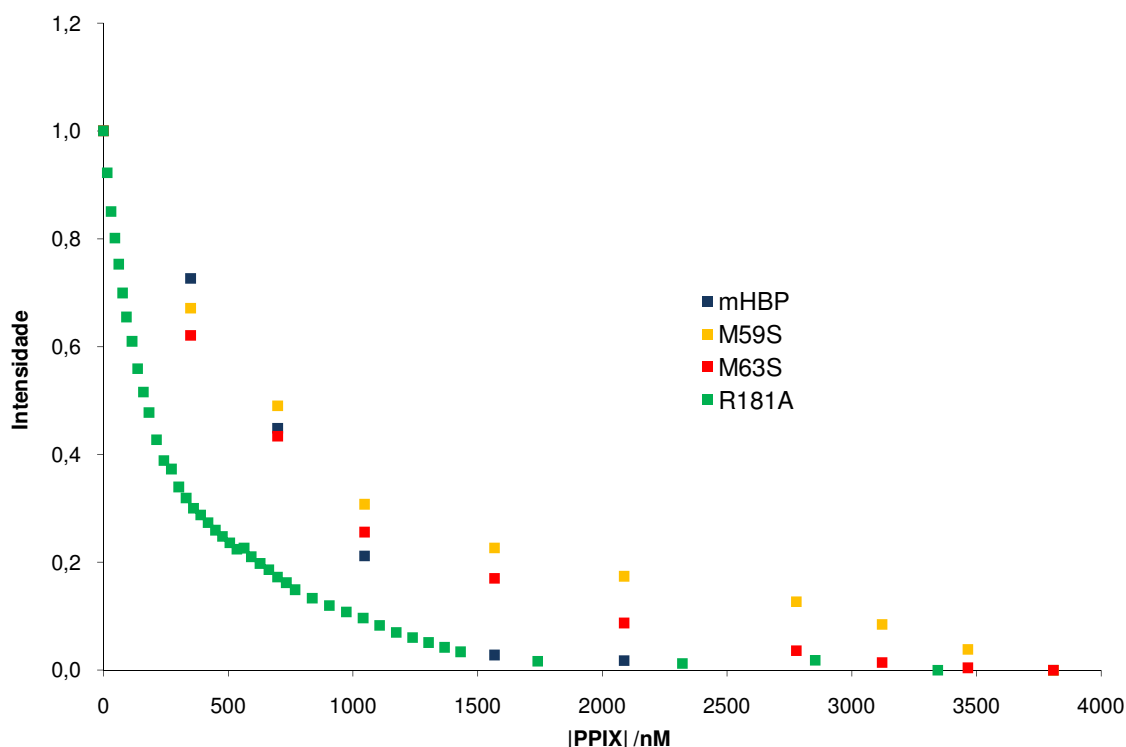


Figura 25. Gráfico que relaciona a intensidade de emissão fluorescência de HBP e respectivos variantes, com a concentração de PPIX em solução.

As constantes de dissociação (K_d) foram determinadas segundo um modelo apresentado por Swillens em 1995 que apresentou uma equação para as ligações não específicas e para os casos em que não existe ligando em excesso na solução [24].

Esta regressão não linear aplica-se ao presente caso uma vez que os ligandos, neste caso os compostos tetrapirrólicos, se vão ligar à proteína não havendo excesso de porfirinas em solução.

$$y = I_0 - (I_0 - I_{int}) \frac{\sqrt{K_d - 3 \cdot [HBP] \cdot x - (K_d - [HBP] \cdot x)^2}}{2 \cdot [HBP]}$$

Equação 2. Equação usada para a determinação da K_d , que relaciona a emissão máxima da mHBP (y) em função da concentração de porfirina (x), onde I_0 é a intensidade de emissão na ausência de

porfirina, I_{int} a intensidade de emissão para a concentração saturada de porfirina, e $[HBP]$ a concentração da proteína.

Aplicando a equação 2 determinaram-se as constantes de dissociação para a mHBP e respectivos variantes, M59S, M63S e R181A.

Proteína	K_d (nM)	
	Hemina	PPIX
mHBP	$11 \pm 0,6$	$17 \pm 0,4$
R181A	56 ± 5	$20 \pm 0,7$
M63S	$12 \pm 0,8$	45 ± 10
M59S	43 ± 8	78 ± 14

Tabela 4. Valores das constantes de dissociação (K_d , nM) determinadas por regressão não linear a partir da equação 1, para a mHBP e respectivos variantes quando em solução com a PPIX e Hemina.

4 Discussão

Analisando os valores obtidos para as constantes de dissociação da HBP e respectivos variantes podemos afirmar que as constantes de dissociação são da mesma ordem de grandeza quando determinadas quer a partir da interação com a Hemina quer com a PPIX. Este dado vem confirmar que a presença ou ausência do átomo de Ferro não tem qualquer influência no modo de interação dos grupos tetrapirrólicos com a proteína.

Comparando a proteína mHBP, no seu estado selvagem, com os respectivos mutantes, podemos afirmar que as mutações introduzidas na proteína não vão alterar o modo de interação desta com o grupo tetrapirrólico uma vez não existir grande variação nos valores das constantes de dissociação. (constantes de dissociação da mesma ordem de grandeza). A alteração de polaridade na zona de interação, conseguida através da introdução de cadeias polares dos resíduos de serina, em substituição das cadeias apolares dos resíduos 56 e 63 de metionina, não alteraram o grau de afinidade destas proteínas pelos grupos tetrapirrólicos uma vez as constantes de dissociação serem da mesma ordem de grandeza. O mesmo acontece para o caso da substituição do resíduo R181, com cadeia lateral básica, por um resíduo apolar, como é o caso da alanina.

No entanto, poder-se-á apontar alguns factores que poderão influenciar o cálculo das constantes de dissociação. O número de leituras feitas numa amostra poderá influenciar a determinação das constantes de dissociação, isto é, se compararmos o estudo feito para o caso de R181A quando em solução com a PPIX, constatamos que o número de leituras feitas foram superiores, às realizadas para as outras amostras com a PPIX, originando assim uma regressão mais aproximada do real quando comparada com as restantes.

Capítulo III – Construção de variantes de HBP

1 Introdução

Neste capítulo, pretende-se construir variantes de mHBP através do processo de mutagénese dirigida, usando *megaprimers* portadores das mutações desejadas.

A zona de interacção da p22HBP é composta essencialmente por resíduos apolares que criam uma zona de ligação hidrofóbica exposta ao solvente, sendo esta propriedade conservada entre as sequências de HBP humana e dos ratos.

Esta propriedade estrutural da HBP, permite aos grupos tetrapirrólicos, quando colocados em solução com a HBP, expor os seus grupos propionatos estabilizando assim a ligação.

Estudos de modelação molecular revelaram que a arquitectura da zona de interacção da mHBP, permite que os grupos propionatos dos tetrapirróis, sejam estabilizados pelas cargas positivas dos resíduos localizados no centro desse local de ligação, tais como arginina 56, lisina 64, e lisina 177 (176 na p22HBP humana) (figura 26 e 27).

Assim sendo, a construção de mutantes, em que haja a substituição destes resíduos básicos, serão fundamentais para perceber qual o efeito na interacção com os grupos tetrapirrólicos, se estas cargas positivas não estiverem presentes.

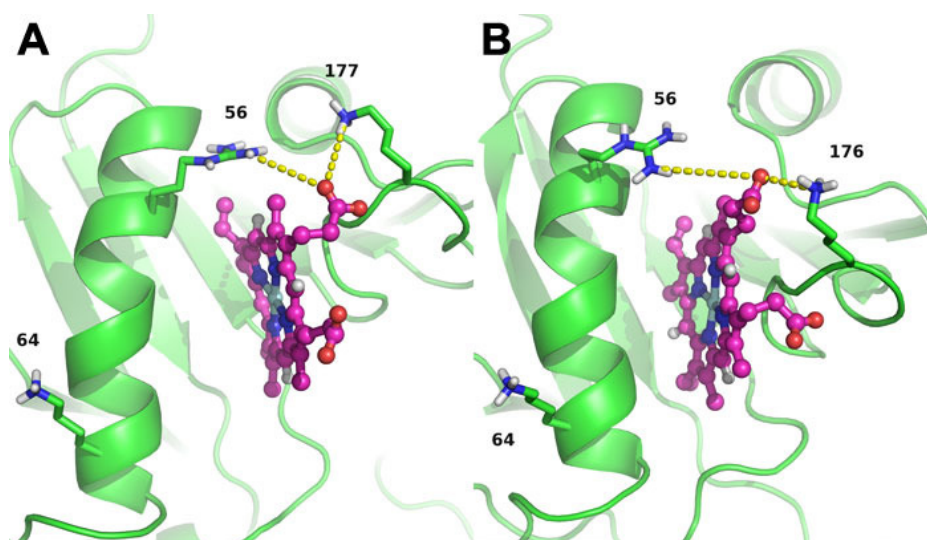


Figura 26. Estrutura representativa do complexo hemina-mHBP (A) e do complexo hemina-hHBP (B), onde se pode ver a zona de interacção, sendo a proteína representada por *cartoons* e a hemina por *sticks*.

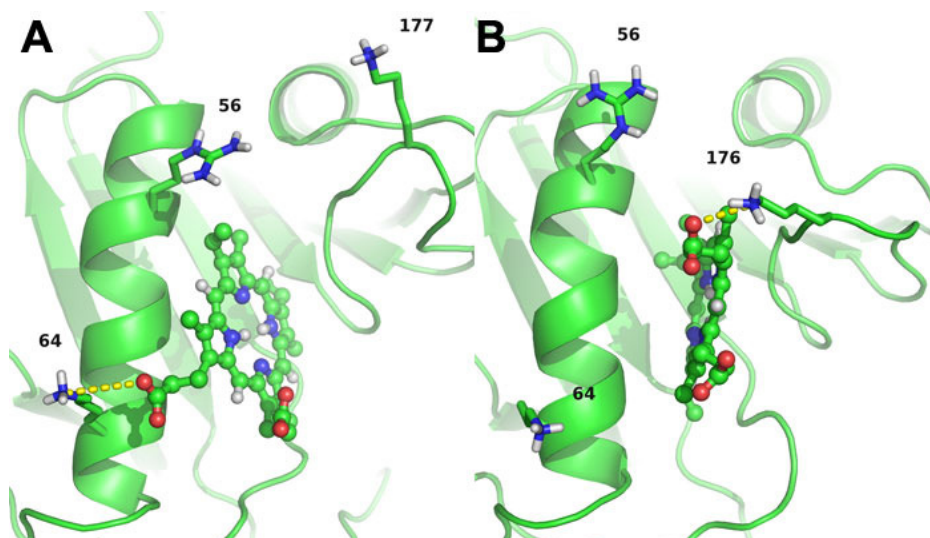


Figura 27. Estrutura representativa do complexo PPIX-mHBP (A) e do complexo PPIX-hHBP (B), onde se pode ver a zona de interacção, sendo a proteína representada por *cartoons* e a hemina por *sticks*. Os resíduos envolvidos na interacção estão também assinalados com *sticks*.

Mutagénese Dirigida

Para a produção dos variantes acima mencionados utilizou-se a mutagénese dirigida associada à reacção em cadeia da polimerase (PCR) de todo o plasmídeo *whole-plasmid* (WP-PCR). A mutagénese dirigida tem sido uma das mais utilizadas na biologia molecular no que respeita à tecnologia de DNA recombinante. Os avanços na tecnologia de DNA recombinante tem aumentado a capacidade dos investigadores de manipular o DNA, traduzindo-se num grande avanço científico nomeadamente nos estudos estruturais e funcionais das proteínas [25].

Durante os últimos anos foram desenvolvidos e explorados diversos métodos para obter DNA mutante. Inicialmente todas as abordagens estavam focadas nas mutações aleatórias de DNA cromossomal induzidas por raio-X, e por processos químicos [3]. Apesar destas técnicas terem representado um marco importante nos estudos genéticos, estão limitadas por não poderem marcar a mutação num determinado gene. Por outro lado as técnicas de mutagénese aleatória obrigam a um rastreio ou a uma selecção sobre um elevado número de mutantes para obter o mutante desejado. A possibilidade de manipular o DNA *in vitro*, através do uso de plasmídeos veio fomentar o desenvolvimento de novas tecnologias, que permitem a modificação do DNA em locais específicos desejados.

A mutagénese dirigida foi pela primeira vez usada na década de 70, quando genes isolados foram sujeitos a determinadas condições tais como a exposição a agentes químicos ou incorporação de nucleótidos para estudar os seus efeitos mutagénicos. Durante este tempo, o uso de plasmídeos como vectores na replicação de DNA alargou o campo de estudo no que respeita às mutações permitindo o desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular [25].

A mutagénese localizada numa determinada região do DNA supõe várias técnicas, umas mais usadas que outras podendo estas ser agrupadas em três categorias: 1) métodos de reestruturação de fragmentos de DNA, tais como mutagénese de cassette; 2) mutagénese aleatória localizada 3) mutagénese dirigida - oligonucleótidos. A mutagénese dirigida com recurso a oligonucleótidos é sem dúvida o método mais utilizado [25].

A mutagénese dirigida permite que um ou mais resíduos de aminoácidos seleccionados numa proteína sejam alterados para estudos estruturais e/ ou funcionais de proteínas. Neste presente trabalho a mutagénese dirigida permitiu alterar resíduos nos locais chave de interacção com os grupos tetrapirrólicos, permitindo assim alargar os estudos sobre a afinidade da proteína mHBP aos grupos tetrapirrólicos tendo em vista a compreensão da função da mesma.

Este processo assenta em três etapas fundamentais:

- 1- Selecção de primers
- 2- Amplificação do plasmídeo seleccionado através de PCR
- 3- Transformação

Selecção de primers

A alteração dos resíduos seleccionados faz-se mediante o uso de oligonucleótidos (*primers*) que codificam a mutação desejada. Os primers são cadeias simples de DNA constituídas por 15 a 30 nucleótidos, sendo desenhados por forma a conter a sequência complementar da zona do plasmídeo ao qual pretendemos que ele se ligue. Este é então emparelhado com uma cadeia simples de DNA (plasmídeo), servindo como iniciador da

síntese de uma nova cadeia de DNA. Esta nova cadeia vai assim incorporar a mutação desejada.

Para que ocorra emparelhamento dos primers ao plasmídeo, este tem de ser desnaturado, isto é, a cadeia dupla convertida em cadeia simples. Existem diferentes métodos para a desnaturação de DNA, como a hidrólise alcalina ou o aumento da temperatura. Neste estudo propriamente dito, como a técnica se baseia essencialmente em reacções de PCR o DNA foi desnaturado através do aumento de temperatura até 95°C.

Amplificação do plasmídeo através de PCR

A reacção de PCR, baseia-se no processo de replicação de DNA que ocorre *in vivo*. A enzima responsável por esta polimerização é a DNA polimerase termo-estável (Taq), tendo sido inicialmente isolada a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* que vive em elevadas temperaturas. É essencial que a enzima usada seja estável ao calor, uma vez que os ciclos de PCR têm lugar a temperaturas situadas entre os 50 e 95 °C. A enzima polimerase é a responsável pela construção das cópias de DNA a partir de DNA modelo.

Para além da polimerase são também necessários os primers complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a actuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar.

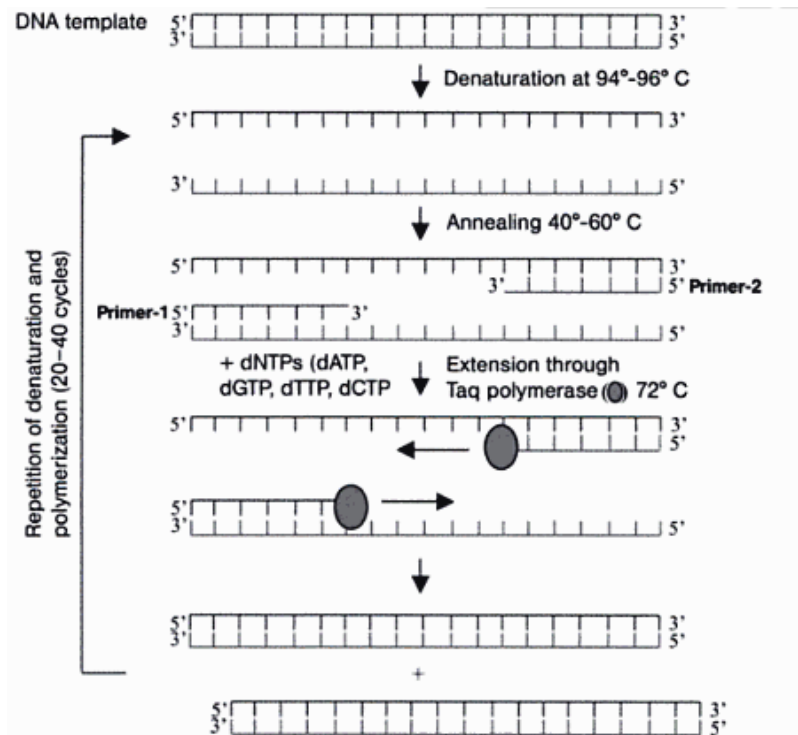


Figura 28. Esquema representativo da reação de PCR. A cadeia de DNA molde é previamente desnaturada havendo posteriormente a hibridação dos primers *forward* (primer 1) e *reverse* (primer 2) às respectivas cadeias de DNA. Na fase de extensão, os primers vão ser alongados através da Taq polimerase, ao longo do DNA modelo, resultando na formação de dois fragmentos de cadeia dupla de DNA. Estes fragmentos vão entrar no ciclo seguinte de PCR, havendo duplicação dos mesmos e assim sucessivamente [3].

Numa reacção de PCR é então necessário um DNA molde, um tampão salino contendo a polimerase, os primers, os quatro desoxinucleotídeos constituintes do DNA e o cofactor da polimerase Mg^{2+} . Um ciclo de PCR (figura 28) consiste em três fases: desnaturação do DNA molde (*melt*), hibridação (*annealing*) dos *primers* e polimerização do DNA (*extension*).

Na primeira etapa, a desnaturação do DNA alvo faz-se através do calor, de modo a separar as duas cadeias (normalmente um minuto a 94-96 °C). Esta separação é essencial para que, na segunda etapa, haja hibridação dos primers por ligações de hidrogénio ao DNA alvo em cadeia simples. Para que ocorra esta associação a reacção é arrefecida (temperaturas entre 50 e 65 °C, durante um minuto), sendo a temperatura ideal dependente da percentagem de guaninas e citosinas presentes na sequência a amplificar. Após a hibridação, dá-se a

extensão dos primers através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela enzima Taq polimerase (um minuto a 72°C).

Este ciclo é normalmente repetido entre 25 a 30 vezes sendo este processo efectuado num termociclador, que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo de cada ciclo. Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo completo de PCR logo dá-se um crescimento exponencial, havendo ao fim de n ciclos, 2^n vezes mais cópias do que no início. [26]

Durante a última década têm sido descritos diversos protocolos para PCR tendo em vista a mutagénese dirigida. Um dos problemas com que se depara a reacção de PCR é a introdução de mutações secundárias indesejáveis devido à baixa especificidade de diversas polimerases. Os *megaprimers* são construídos através da polimerização de toda a cadeia do plasmídeo modelo, partindo do primer que contem a mutação [27].

MEGAWHOP – Megaprimer PCR of whole plasmid

O método de *megawhop* foi desenvolvido no sentido de facilitar a amplificação de fragmentos de DNA. Neste método o fragmento de DNA que se pretende amplificar é usado como megaprimer que vai substituir a região homóloga no plasmídeo usado como modelo. A amplificação de todo o plasmídeo permite a introdução da mutação no DNA molde, sem que seja necessário a inserção do primer no próprio plasmídeo. [28]

Após a reacção de PCR de todo o plasmídeo, usando o megaprimer, a mistura resultante vai ser tratada com uma enzima de restrição específica para fragmentos de DNA *dam*-metilados – Dpn I. O tratamento com esta enzima de restrição permite a eliminação do plasmídeo original, metilado, ao contrário do DNA gerado por PCR, uma vez este último não ser metilado [28].

A Dpn I é uma enzima de restrição isolada a partir de uma estirpe de *E.coli* que contem o gene clonado para a síntese de DpnI a partir de *Diplococcus pneumoniae* G41, cujo sítio de clivagem é indicado na figura 29.

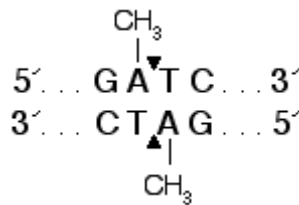


Figura 29. Zonas de restrição da enzima DpnI.

Os produtos de PCR, os *megaprimers*, bem como os fragmentos de DNA produzidos pela reacção com a enzima Dpn I podem ser quantificados por electroforese em gel de agarose sendo o seu tamanho estimado por comparação com padrões lineares de DNA.

Electroforese em gel de agarose

A eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida pode ser usada para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA. A técnica é simples, rápida e capaz de determinar fragmentos de DNA que não podem ser separados adequadamente por outros processos.

Os ácidos nucleicos são poliácidos, carregados negativamente, o que os faz migrar para o pólo positivo quando submetidos a um campo eléctrico. Este processo de separação depende da voltagem usada, as propriedades do gel, bem como a carga e estrutura da molécula em questão [3].

O método usado para a separação de fragmentos de DNA é escolhido em função do tamanho do fragmento e da resolução que se pretende obter. A electroforese em gel de agarose é um procedimento *standard* na separação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Este tipo de gel tem menor capacidade de resolução, quando comparado com o gel de poliacrilamida, no entanto é indicado para a separação de longos fragmentos de

DNA (50-20000 pb). No gel de poliacrilamida os fragmentos a separar possuem apenas entre 5 a 500 pb [3].

A agarose é um polissacarídeo extraído das algas vermelhas, sendo adicionado a um tampão de electroforese e dissolvido pelo aquecimento do mesmo. A presença de grupos hidroxilo (R-OH) permite a formação de ligações por pontes de hidrogénio que vão constituir a matriz de agarose, que será mais forte quanto maior a percentagem de agarose. A maioria dos géis tem uma concentração de agarose entre 0,7 e 2 % , sendo que um gel de 0,7% possui uma boa resolução (separação de bandas) para fragmentos de DNA maiores (5-10 Kb) e um gel de 2% é indicado para análise de fragmentos de menores dimensões (0,2 a 1 Kb) [3].

A velocidade a que os fragmentos de DNA migram ao longo do gel de agarose, quando sujeito a um campo eléctrico, depende acima de tudo do tamanho dos próprios fragmentos. Para além do tamanho, existem outros factores que vão influenciar a velocidade de migração tais como o tampão usado, a percentagem de agarose presente no gel, a voltagem usada e a conformação das moléculas de DNA [3].

A localização do DNA no gel pode ser determinada directamente pela coloração através de fluoróforos como, por exemplo, o brometo de etídio. Este corante vai-se intercalar com as moléculas de DNA, formando complexos fluorescentes, visíveis através de luz ultra-violeta [3].

Transformação

Após a electroforese em gel de agarose, os vectores portadores das mutações em estudo devem ser introduzidos em bactérias hospedeiras para serem amplificados. Este processo designado por transformação ou transfecção pode ser conseguido de várias formas, existindo dois métodos principais: transformação química e electroporação [29].

Antes do processo de transformação, deve-se ter em conta a preparação das células hospedeiras nas quais se vão introduzir os vectores. Estas células, conhecidas por células competentes, tem origem em culturas bacterianas que são recolhidas, por centrifugação, na

sua fase exponencial de crescimento e imediatamente ressuspendidas num volume reduzido de solução refrigerada de glicerol 20%, para que se atinja uma densidade celular elevada. As células competentes podem ser usadas logo após a ressuspensão com a solução de glicerol, em que a sua eficácia é máxima, ou então conservadas a - 80 °C (ocorre ligeira diminuição de eficácia) [3].

Na transformação química as células competentes são ressuspendidas num tampão contendo cloreto de cálcio 100 mM. Posteriormente é adicionado o DNA plasmídico que contem a mutação desejada e as células são sujeitas a um choque térmico de 42 °C durante aproximadamente um minuto [29].

O processo de electroporação tem-se revelado um método bastante eficiente na transformação de células competentes, sendo a taxa de eficiência de 10^7 a 10^8 células transformadas por μg de DNA, o que excede a eficiência da transformação química num factor de 10 a 100. As células competentes são sujeitas a um impulso eléctrico forte, (2,5 kV, 25 μF , 200 Ω) ficando as paredes bacterianas temporariamente permeáveis, permitindo a entrada dos plasmídeos de expressão. Este método, no entanto, pressupõe a disponibilidade de um electroporador e cuvetes apropriadas. Para além disso, a quantidade de sais presentes na solução que contem o DNA poderá influenciar a electroporação, sendo portanto aconselhável uma concentração mínima de sais [30].

Após o processo de transformação, em que as células são sujeitas a condições agressivas, deve-se proceder à recuperação das mesmas, colocando-as a uma temperatura óptima de crescimento de 37 °C, num meio rico em glucose e sais, normalmente meio SOC (composição descrita nos métodos), sem a adição de qualquer antibiótico. Após o tempo de recuperação celular, as células são crescidas na presença do antibiótico para o qual apresentam resistência, e após o seu crescimento (cerca de 12 a 16 horas, a 37 °C) o DNA é extraído das bactérias e terá de ser analisado posteriormente para se confirmar se as mutações foram introduzidas correctamente, recorrendo-se então a técnicas de sequenciação de DNA.

Sequenciação

A caracterização completa de um fragmento de DNA requer a determinação da sua sequência de nucleótidos. [3]. O pioneiro na sequenciação de DNA foi Frederick Sanger que, juntamente com os seus colegas, pela primeira vez determinaram a sequência dos aminoácidos da insulina, valendo a Sanger o prémio Nobel em 1957.

O método consiste na síntese de cadeias a partir do fragmento de DNA a ser sequenciado - cadeias essas que são marcadas radioactivamente numa extremidade e diferem entre si por um nucleótido. Por separação das cadeias truncadas através de electroforese, pode estabelecer-se a sequência de nucleótidos do fragmento de DNA original.

A síntese das cadeias truncadas é conseguida pelo uso de ddNTPs (didesoxirribonucleosídeos trifosfatados), os quais, e ao contrário dos dNTPs (desoxirribonucleosídeos trifosfatados), não possuem o grupo 3'-OH (figura 30). Assim, embora possam ser usados pela DNA polimerase na síntese de cadeias de DNA, não permitem a formação duma ligação fosfodiéster com outro nucleótido trifosfato, pelo que a sua incorporação na cadeia resulta numa cadeia truncada, nesse ponto.

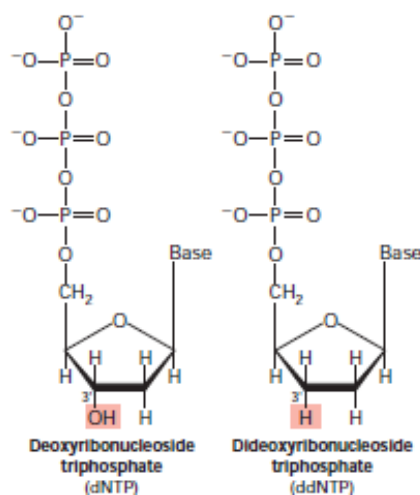


Figura 30. Estrutura de uma molécula de didesoxirribonucleosídeo trifosfatado (ddNTP) e de uma molécula de desoxirribonucleosídeo trifosfatado (dNTP).

Assim, inicialmente procede-se à desnaturação do fragmento de DNA de dupla cadeia, originando cadeias molde para a síntese *in vitro* de DNA. São necessários primers para que se inicie a reacção pela DNA polimerase. É também o primer que define qual a cadeia que é usada como molde. Usam-se ainda baixas concentrações de ddNTPs e altas

concentrações de dNTPs. Em cada reacção, um ddNTP é incorporado aleatoriamente na posição do dNTP correspondente, provocando a terminação da polimerização nessa mesma posição (figura 31).



Figura 31. Esquema representativo da truncagem, dos fragmentos de DNA através de dideoxi-guanina trifosfato (ddGTP).

A inclusão de marcadores fluorescentes com diferentes cores para cada tipo de ddNTP permite a distinção das cadeias truncada pela respectiva fluorescência. Por exemplo, todas as sequências truncadas que terminem com um ddGTP podem ter fluorescência de cor amarela, as terminadas com ddATP com cor vermelha, etc., independentemente dos seus tamanhos (figura 32). Para obter a sequência completa da cadeia molde de DNA, são efectuadas 4 reacções, cada uma com um ddNTP diferente. O ddNTP que termina a cadeia truncada pode ser identificado pois cada ddNTP está marcado com moléculas fluorescentes de diferentes cores (indicadas pelas cores destacadas na figura 32).

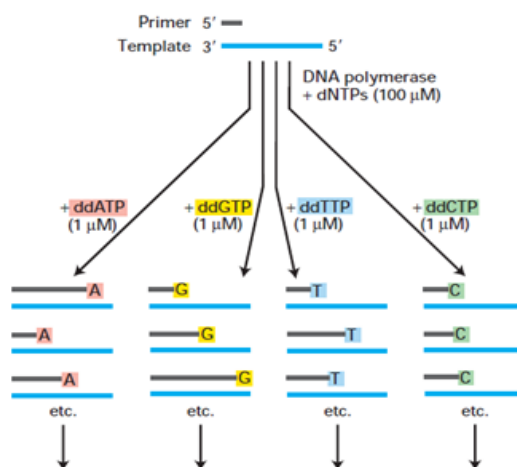


Figura. 32 Esquema representativo da truncagem dos fragmentos com os quatros ddNTPs correspondentes às quatro bases existentes (ddATP- adenina, ddGTP- guanina, ddTTP-timina, ddCTP-citosina).

Por electroforese das sequências truncadas em gel de poliacrilamida, separam-se as diferentes cadeias simples de DNA (as quais diferem entre si apenas por um nucleotídeo). Esta detecção de fluorescência e distinção entre os quatro marcadores fluorescentes poderá ser feita a partir de sequenciadores que possuem um detector de fluorescência no final do gel de electroforese. A sequência da cadeia molde de DNA pode ser determinada a partir da ordem em que os diferentes fragmentos marcados radioactivamente passam pelo detector, sendo que os fragmentos mais pequenos são os primeiros a chegar ao detector.

Actualmente existem métodos de sequenciação automática em que não é necessário separar as reacções dos diferentes ddNTPs havendo possibilidade de fazer esta marcação na mesma reacção. Os sequenciadores automáticos mais actuais possuem um sistema de capilares em substituição do gel, ocorrendo a electroforese ao longo do capilar. A ordem de chegada dos diferentes fragmentos é directamente registada num cromatograma como o exemplificado na figura 33.

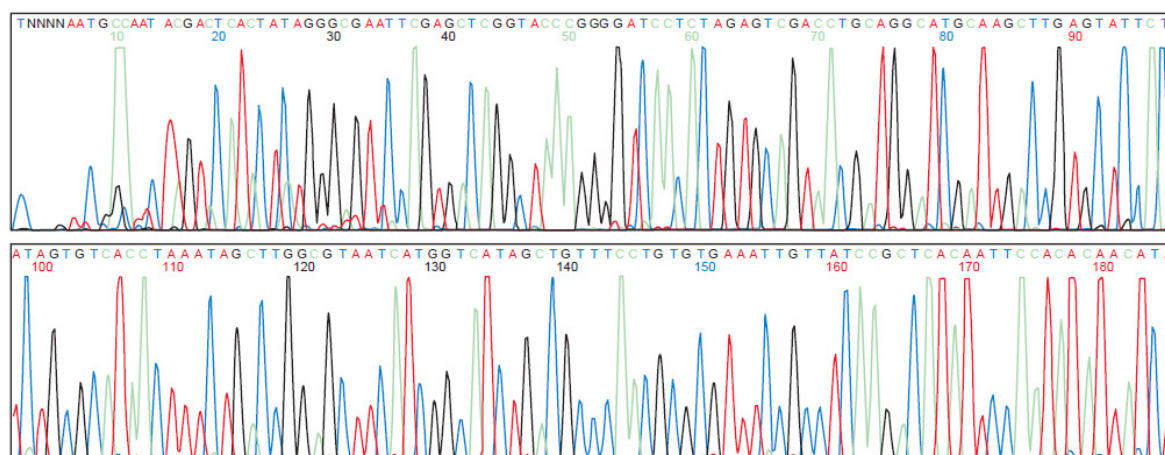


Figura 33. Cromatograma resultante da sequenciação automática de um fragmento de DNA. Os nucleótidos N, são nucleótidos que o detector não conseguiu identificar.

As sequências obtidas através dos cromatogramas são então analisadas, no sentido de detectar se existe alguma mutação desejada ou indesejada. A tradução das sequências de bases para a sequência de aminoácidos que lhe corresponde faz-se através do código genético (tabela 5).

		2ª base				
		T	C	A	G	
1ª base	T	Phe	Ser	Tyr	Cys	T
		Phe	Ser	Tyr	Cys	C
		Leu	Ser	STOP ³	STOP ³	A
		Leu	Ser	STOP ³	Trp	G
	C	Leu	Pro	His	Arg	T
		Leu	Pro	His	Arg	C
		Leu	Pro	Gln	Arg	A
		Leu ²	Pro	Gln	Arg	G
	A	Ile	Thr	Asn	Ser	T
		Ile	Thr	Asn	Ser	C
		Ile	Thr	Lys	Arg	A
		Met ¹	Thr	Lys	Arg	G
	G	Val	Ala	Asp	Gly	T
		Val	Ala	Asp	Gly	C
		Val	Ala	Glu	Gly	A
		Val ²	Ala	Glu	Gly	G

Tabela 5. O código genético representado por codões de DNA. **1.** Codão de iniciação mais comum. **2.** Codões que, embora codifiquem a Leucina (CTG) ou a Valina (GTG), poderão codificar a metionina para iniciar uma cadeia de aminoácidos. **3.** Codões STOP que caracterizam o terminal carboxílico das cadeias polipeptídicas na maioria das células. [18]

A sequenciação revela-se assim uma ferramenta fundamental para confirmar se as mutações desejadas foram introduzidas de uma forma correcta na sequência original da mHBP.

2 Material e métodos

2.1 Purificação do plasmídeo pNJ2

O DNA usado como modelo foi o plasmídeo que contem a sequencia que codifica a HBP, designado por pNJ2. O mapa deste plasmídeo pode ser consultado nos Anexos II.

Este DNA foi extraído de uma cultura de células DH5 α , transformadas com o plasmídeo pNJ2, crescidas em meio LB com ampicilina 50 mg/mL. As células foram recolhidas por centrifugação sendo o DNA purificado através do kit para purificação de plasmídeos da QIAGEN [31].

2.2 Primers

Tal como referenciado anteriormente, para a mutagénese dirigida é necessário desenhar os primers que codificam as mutações de interesse. Na tabela 6 encontra-se descrito a designação dos variantes de HBP bem como os *primers* que codificam as respectivas mutações (*primers* terminal 5’).

	Variantes	Primer terminal 5’	Primer terminal 3’
HBP-7	K177A	HBP-7	PBRevo2
HBP-8	R56A	HBP-8	HBP-R2
HBP-9	K64A	HBP-9	HBP-R2
HBP-10	K177E	HBP-10	PBRevo2
HBP-11	R56E	HBP-11	HBP-R2
HBP-12	K64E	HBP-12	HBP-R2
HBP-13	M59C	HBP-13	HBP-R2
HBP-14	R56A / K64A	HBP-14	HBP-R2

Tabela 6. Variantes da HBP, respectivas mutações e primers que codificam as mutações. HBP-R2 5'-TTA TAA GGA TCC TCA TGC CTT CAC AAG CCA GAC CTC GT-3'; pBRevo2 -5' TAC GAG TTG CAT GAT AA -3'.

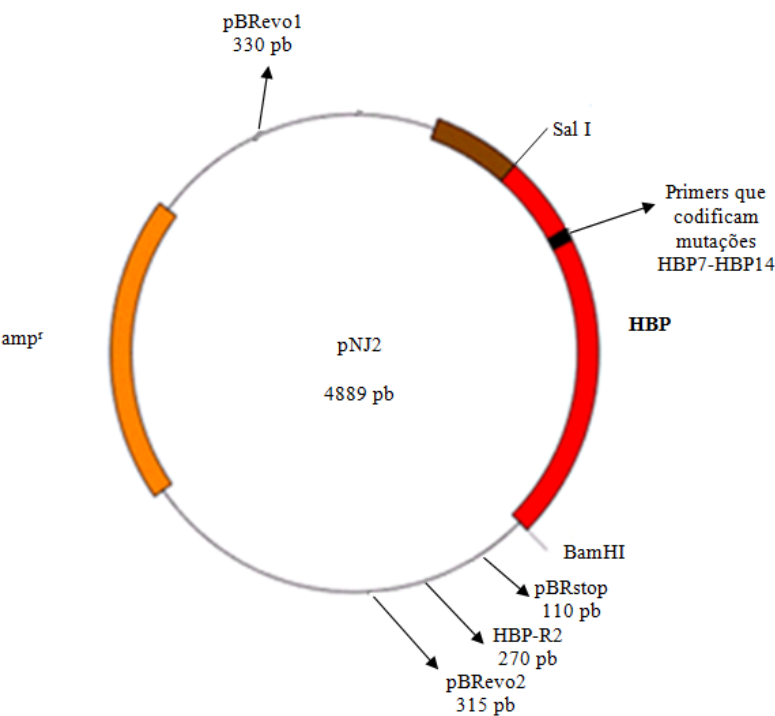


Figura 34. Plasmídeo pNJ2 e respectivas zonas de *annealing* de alguns *primers*.

Na figura 34 é possível observar os locais de *annealing* dos diferentes *primers*, nomeadamente os primers pBRevo2 e os portadores das mutações HBP7-HBP14. Tendo em conta os *primers* usados, podemos afirmar que os *megaprimers* terão aproximadamente 500 pb.

Os *primers* portadores das mutações, foram desenhados de acordo com a mutação pretendida em cada variante de mHBP, tendo sido adquiridos comercialmente à *Integrated DNA Technologies*. As sequências de cada *primer* encontram-se descritas na tabela 7.

Primer	Variante	Sequência
HBP7	K177A	<u>GACCCTCCCATGGCGCCCTATGGACGC</u>
HBP8	R56A	<u>GTGGATGAGGCTCTCGCGGAAGCGATGCCCAAG</u>
HBP9	K64A	<u>GCCCAAGATCATGGCGTATGTGGGTGGCACC</u>
HBP10	K177E	<u>GACCCTCCCATGGAGCCCTATGGACGCCGT</u>
HBP11	R56E	<u>GTGGATGAGGCTCTCGAGGAAGCGATGCCCAAG</u>
HBP12	K64E	<u>GCCCAAGATCATGGAGTATGTGGGTGGCACC</u>
HBP13	M59C	<u>TCCGGGAAGCGTGTCCCAAGATCATGA</u>
HBP14	R56A / K64A	<u>GTGGATGAGGCTCTCGCGGAAGCGATGCCCAAGATCATGGCGTATGTGGGTGGCACC</u>

Tabela 7. *Primers* que codificam as mutações, assinaladas a azul, para os diferentes variantes de HBP.

2.3 Megaprimers

Para as reacções de PCR, foi adicionado a cada tubo de PCR 5 µL de DNA molde (pNJ2) [4ng/µL], 8 µL dos respectivos primers 5' [20 µM], 20 µM; 2,5 µL de primer 3', [20 µM]; 1 µL de enzima vent polimerase (*New England Biolabs*), 10 µL de tampão thermo 10x (*New England Biolabs*) [200 mM Tris-HCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 1 % Triton X-100]; 16 µL de dNTPs 1,25 mM, perfazendo no final o volume até 100 µL com água ultrapura. Foi ainda adicionado a cada tubo 60 µL óleo mineral,

formando-se assim uma camada no topo de cada tubo, evitando a evaporação dos reagentes.

Os tubos de PCR foram colocados no termociclador (MJ mini gradient thermal cycler da BioRad) sendo então programados os ciclos de PCR de acordo com a tabela 8.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
1	94	04:00
2	55	1:00
3	72	2:00
4	94	0:40
5	55	1:00
6	72	1:00
7	Repetição dos passos 4, 5 e 6 , 27 vezes	
8	72	5:00
9	4	

Tabela 8. Combinações de tempo/ Temperatura usadas em PCR

Os produtos de PCR obtidos, *megaprimers*, foram purificados através do kit da QIAGEN [32]. Depois de purificados os *megaprimers* foram quantificados por electroforese em gel de agarose 1%.

Preparação do gel de agarose

O gel de agarose foi preparado através da dissolução, por aquecimento durante 1 minuto em microondas, de 0,5 mg de agarose em 50 mL de tampão TBE, sendo posteriormente adicionado 3 µL de brometo de etídio. Esta solução foi aplicada na cassete, previamente montada para o efeito, deixando-se a agarose polimerizar completamente.

Depois do gel polimerizado, colocou-se a cassete na tina de electroforese, previamente preenchida com o tampão de corrida TBE. As amostras, 1 µL DNA, foram eluídas com 4 µL de tampão de eluição (tampão TE + azul de bromofenol). O marcador usado para quantificar os *megaprimers* foi o ϕ 174 DNA-Hae III digest da New England Biolabs.

2.4 *Whole Plasmid PCR*

As reacções de *Whole plasmid* PCR foram realizadas da mesma forma que as programadas para a construção dos *megaprimers*. Neste caso os primers 3' e 5', são substituídos pelo respectivo megaprimer obtido anteriormente. Para além disso é também adicionado o cofactor da enzima polimerase, sob a forma de $MgSO_4$.

Adicionados todos os reagentes, os tubos de PCR foram colocados no termociclador, sendo as etapas do termociclador as descritas na tabela 8.

Nas reacções de *Whole plasmid* PCR, foi preparado para cada mutante o respectivo controlo. Cada controlo é preparado de igual forma que as amostras sendo que a única diferença é que os tubos de PCR contendo os controlos não são sujeitos aos ciclos de PCR, permanecendo a 4°C.

Os produtos de PCR resultantes, bem como os respectivos controlos, foram posteriormente analisados através de electroforese em gel de agarose 1%, sendo o marcador usado o λ -DNA-BstE *digest* da *New England Biolabs*.

2.5 *Tratamento com Dpn I*

Após as reacções de WP-PCR, foi adicionado cuidadosamente a cada tubo de PCR, incluindo os controlos, 1 μ L da enzima Dpn I. Esta adição deve ser feita no fundo do tubo de PCR para que a enzima não fique retida na camada de óleo mineral previamente adicionada, condicionando a eficácia desta etapa. A mistura é então homogeneizada e colocada num banho a 37°C durante cerca de 45 minutos.

Posteriormente, os produtos de MEGAWHOP e respectivos controlos, tratados com DpnI foram purificados, como anteriormente, através do kit da QIAGEN para purificação de produtos de PCR [32].

Para avaliar a eficácia da digestão da enzima Dpn I, os seus produtos foram analisados por electroforese em gel de agarose 1%, sendo o marcador λ -DNA-BstE *digest* da *New England Biolabs* usado como referência.

2.6 .Preparação de células competentes

Para a preparação de células competentes, usou-se uma colónia fresca de *E. coli* DH5α e inoculou-se 10 mL de LB, deixando-se em agitação durante 12 a 16 horas, a 37°C. Este pré-inoculo foi então adicionado a 1 L de LB, colocando-se novamente a cultura em crescimento com agitação a 37°C até se obter uma Abs₆₀₀ entre 0,5 e 1,0, sendo esta observância um indicador de uma densidade celular apropriada para a recolha de células.

A recolha das células foi feita por centrifugação das células a 6000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. Os tubos de centrífuga usados na recolha foram previamente autoclavados para evitar contaminações das células competentes. Após a centrifugação, foi removido o sobrenadante sendo essencial remover a maior quantidade possível para que a concentração de sais presentes nas alíquotas das células competentes seja o menor possível uma vez que estes sais podem influenciar a eficácia da electroporação.

Posteriormente, o *pellet* obtido foi cuidadosamente ressuscitado com 250 mL de uma solução de glicerol 20%, previamente autoclavado e mantido a 4°C. Procedeu-se novamente à recolha de células por centrifugação. Este processo de ressuspensão e recolha foi repetido mais uma vez. No final eliminou-se o sobrenadante cuidadosamente, uma vez que o *pellet* formado com a solução de glicerol é um *pellet* pouco firme. Para preparar diversas alíquotas de células competentes, estas foram ressuscitadas num volume mínimo de glicerol 20% (cerca de 2 a 3 mL), para que a densidade celular seja a maior possível (deverá ser entre 1 e 3 x10¹⁰ células/mL). São então preparadas diferentes alíquotas sendo estas imediatamente usadas ou armazenadas a - 80°C.

2.7 Transformação de células competentes

Para cada reacção de transformação, é adicionado a 40 µL de células competentes, 1 µL de de cada amostra de DNA obtido no passo anterior. O volume de DNA adicionado às células não deverá exceder 1/10 do volume das células para que não haja perda de eficácia da electroporação. As amostras foram mantidas em gelo durante cerca de 10 minutos. Para além dos variantes e respectivos controlos foram preparadas mais duas amostras: controlo

positivo contendo DNA modelo (pNJ2) e controlo negativo, onde não foi adicionado qualquer tipo de DNA.

Durante este tempo de espera, dever-se-á confirmar que o sistema de electroporação está montado correctamente. O sistema de electroporação utilizado na transformação das células competentes foi o sistema de micropulsos para microorganismos da BioRad.

As amostras foram transferidas para as cuvetes de electroporação, mantidas em gelo, sendo a suspensão celular colocada no fundo da cuvette. A cuvette posteriormente foi colocada no suporte onde se aplica o pulso eléctrico. Este pulso deverá ter um tempo constante de 2 a 3 segundos, 1,80 V.

Após a aplicação do pulso eléctrico, as células foram imediatamente ressuspensas em 1 mL de meio LB enriquecido com 20% de glucose estéril, e incubadas a 37°C com agitação. Após esta etapa de recuperação, foram espalhados 300 µL de cada cultura (variantes e controlos) nas respectivas placas de LB com ampicilina. As placas, após o espalhamento das amostras, foram incubadas a 37°C durante 12 horas contabilizando-se no final, o número de colónias presentes por placa.

2.8 Preparação de DNA para sequenciação

Para confirmar se as mutações desejadas foram introduzidas correctamente, foram preparadas amostras de DNA de cada variante para análise por sequenciação.

As células foram recolhidas a partir de uma cultura de 500 mL de LB contendo ampicilina, sendo esta recolha feita por centrifugação a 6000 rpm, centrífuga Beckman J2-HS, desperdiçando-se o sobrenadante. As células foram em seguida ressuspensas em 6 mL de tampão GTE (50 mM glucose, 25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA pH8,0), através de pipetagem e vortex em tubos de centrífuga 50 mL. Posteriormente, foi adicionado a cada tubo 12 mL de NaOH 0,2 M/1% SDS, homogeneizando-se a mistura por inversões repetidas dos tubos de centrífuga. Os tubos foram incubados em gelo durante 5 minutos.

Após este tempo, foi adicionado 9 mL de acetato de amônio 7,5 M, homogeneizando-se novamente por repetidas inversões dos tubos, deixando-se a incubar em gelo durante 5 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos a 15000 rpm, centrífuga *Beckman J2-HS*, 4°C, sendo o sobrenadante recolhido para novos tubos de centrífuga, previamente identificados, rejeitando-se o *pellet*.

Ao sobrenadante foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol, homogeneizando-se imediatamente após, e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm, centrífuga *Beckman J2-HS*, durante 20 minutos à temperatura ambiente, rejeitando-se cuidadosamente de seguida o sobrenadante. O *pellet* foi ressuscitado em 2 mL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0), sendo posteriormente transferido para tubos *falcon* de 15 mL, aos quais se adicionaram 2 mL de cloreto de lítio 5 M. Estas amostras foram deixadas a precipitar em gelo, durante 20 minutos sendo posteriormente centrifugadas a 4000 rpm, centrífuga *Eppendorf 5804*, durante 20 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante é transferido para novos tubos de centrífuga, preferencialmente de vidro, sendo adicionado igual volume de isopropanol, previamente arrefecido em gelo. Agitou-se os tubos, permanecendo estes de seguida a -20°C. O DNA é recolhido por centrifugação a 10000 rpm, centrífuga *Beckman J2-HS*, durante 20 minutos à temperatura ambiente. O *pellet* é então ressuscitado em 0,4 mL de tampão TE e transferido para um microtubo. A este microtubo é adicionado RNAase com uma concentração final de 20 µg/mL, sendo posteriormente incubado a 37°C durante 20 minutos. Após a incubação foi adicionado 0,4 mL de uma solução de cloreto de sódio 1,6 M, 13 % PEG 8000. Esta mistura foi incubada em gelo pelo menos durante 30 minutos e posteriormente centrifugada durante 10 minutos, 10000 rpm, centrífuga *Beckman J2-HS*, a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente, uma vez que nesta fase o DNA é translúcido e poderá facilmente perder-se.

O *pellet* que contem o DNA plasmídico foi ressuscitado em 0,4 mL de tampão TE, procedendo-se de seguida a várias extracções com clorofórmio. Foi adicionado a cada tubo 400 µL de clorofórmio, agitando-se de seguida vigorosamente para misturar as camadas.

Após a centrifugação durante 1 minuto, extraiu-se a camada superior da amostra onde está contido o DNA plasmídico.

Após a última extracção, transferiu-se o DNA para um novo microtubo, e adicionou-se 1/10 volume de acetato de amónio 10 M e 2 volumes de isopropanol, incubando-se durante 10 minutos em gelo. As amostras foram posteriormente centrifugadas durante 15 minutos, a 12000 rpm, à temperatura ambiente. De seguida, descartou-se o sobrenadante estando o DNA precipitado nas paredes do tubo. Este foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado durante 5 minutos a 14000 rpm, microcentrifuga *Eppendorf 5415D*, a 4°C. Após a centrifugação, retirou-se o etanol e secou-se cuidadosamente o microtubo tendo o cuidado de não destruir o DNA, sendo este posteriormente dissolvido em 40 µL de água ultrapura.

O DNA plasmídico obtido para cada variante foi posteriormente quantificado por electroforese em gel de agarose 1%, sendo o marcador λ -DNA-BstE *digest* da *New England Biolabs* a referência usada para quantificar as amostras de DNA

2.9 Sequenciação

As amostras de DNA depois de quantificadas foram enviadas para o serviço de sequenciação da Universidade da Florida, USA [33]:

Para sequenciar as amostras de DNA foi necessário indicar quais os primers pretendidos, para que se sequenciasse a zona de interesse, ou seja, a sequencia que codifica a proteína HBP. Os primers pBRSTOP (5'GAA ACA AGC GCT CAT-3') e pBRevo1 (5'-CAT ATT TGA ATG TAT TTA GA-3') foram os primers usados. O primer pBRSTOP, iniciador da polimerização no sentido 3'-5', foi indicado inicialmente para sequenciar os possíveis mutantes HBP7 e HBP10 uma vez que este vai-se emparelhar na zona próxima do local da mutação (resíduos 177). Por outro lado, o primer pBRevo1 iniciador da polimerização no sentido 5'-3', foi indicado para a sequenciação das restantes amostras, cujas mutações se encontram nos resíduos 56, 59 e 64. (ver mapa da figura 34)

3 Resultados

3.1 Megaprimers

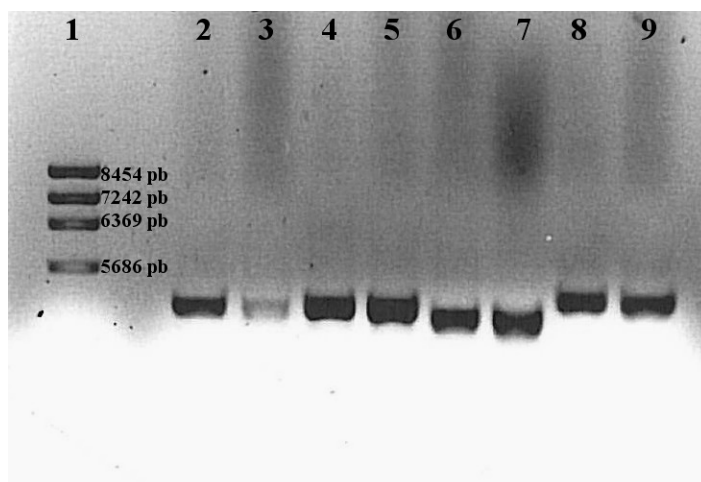


Figura 35. Gel de agarose 1% dos produtos de PCR, *megaprimers*, corrido a 86 V durante 2 horas. No primeiro poço aplicou-se 2 μ L de marcador e nos restantes aplicou-se 1 μ L amostra + 4 μ L tampão de eluição. Legenda: 1- Marcador ϕ 174 DNA-Hae III Digest 200 ng; 2- Megaprimer HBP7; 3 Megaprimer HBP8; 4- Megaprimer HBP9; 5- Megaprimer HBP10; 6- Megaprimer HBP11; 7- Megaprimer HBP12; 8- Megaprimer HBP13; 9- Megaprimer HBP14. Em detalhe encontra-se a distribuição dos pares de bases (bp) pelas diferentes bandas do marcador.

Como se pode verificar pela figura 35, as reacções de PCR foram bem sucedidas uma vez a quantidade de megaprimer presente em cada amostra ser elevada. As bandas correspondentes aos diferentes *megaprimers* possuem uma intensidade superior à primeira banda do marcador correspondente a 1353 pb. Sabendo que a totalidade dos 5386 pb do marcador correspondem a 200 ng de DNA (neste caso, porque foram eluídos 2 μ L de marcador de concentração 100 ng/ μ L), então 1353 pb vão corresponder a uma concentração de 50 ng/ μ L. Podemos assim dizer que a concentração dos *megaprimers* é superior a 50 ng/ μ L. Nesta etapa, o gel de agarose, para além de fornecer dados para a quantificação, é essencialmente útil para confirmar se o megaprimer não foi perdido durante o processo de purificação do mesmo.

3.2 Whole plasmid PCR

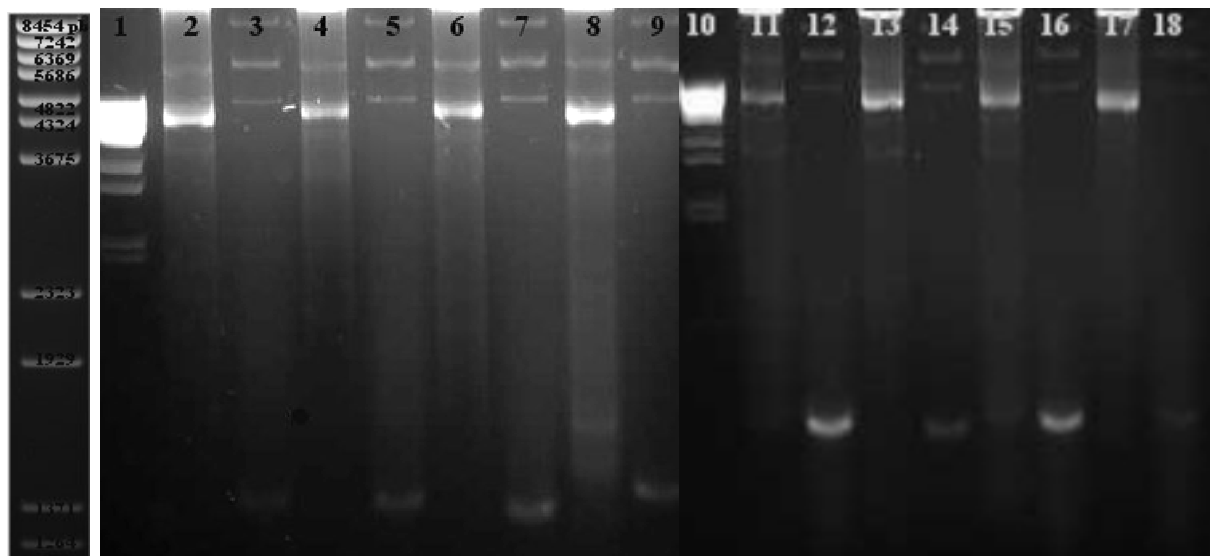


Figura 36. Gel de agarose 1% dos produtos de *whole-plasmid* PCR, corrido a 86 V durante 2 horas. No primeiro poço aplicou-se 2 μ L de marcador e nos restantes aplicou-se 1 μ L amostra + 4 μ L tampão de eluição. Legenda: 1- Marcador λ -DNA-BstE *digest* 200 ng; 2- WP-PCR HBP7; 3- WP-PCR HBP7controlo; 4- WP-PCR HBP8; 5- WP-PCR HBP8controlo; 6- WP-PCR HBP9; 7- WP-PCR HBP9controlo; 8- WP-PCR HBP10; 9- WP-PCR HBP10controlo; 10- WP-PCR HBP11; 11- WP-PCR HBP11controlo; 12- Marcador λ -DNA-BstE *digest* 200 ng; 13- WP-PCR HBP12; 14- WP-PCR HBP12controlo; 15- WP-PCR HBP13; 16- WP-PCR HBP13controlo; 17- WP-PCR HBP14; 18- WP-PCR HBP14controlo.

Na figura 36 encontram-se os géis de agarose dos produtos de WP-PCR, e respectivos controlos. Nas colunas referentes aos controlos é possível identificar a presença dos *megaprimers* que não foram utilizados nas reacções de WP-PCR uma vez que estas amostras permaneceram a 4°C, não sendo sujeitas a PCR. Nas colunas onde foram aplicados os produtos de WP-PCR, surgem umas bandas no topo correspondentes a estes mesmos produtos. A eluição destas bandas foi mais lenta, quando comparado com as bandas correspondentes aos *megaprimers*, uma vez que correspondem a DNA circular (plasmídico).

3.3 Tratamento com *Dpn I*

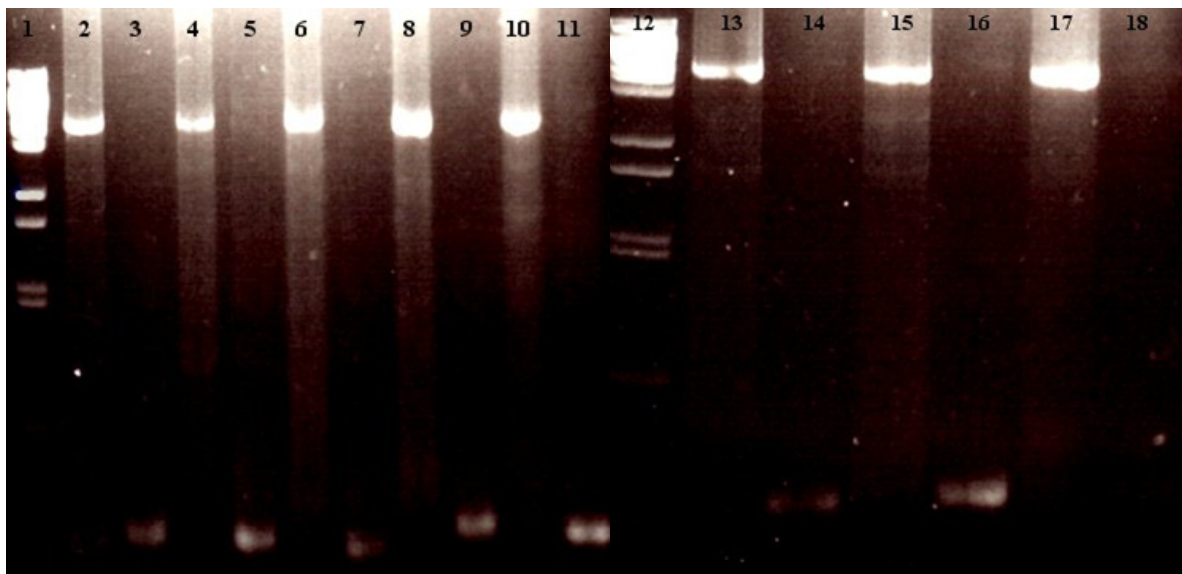


Figura 37. Gel de agarose 1% dos produtos de WP-PCR tratados com *DpnI*, corrido a 86 V durante 2 horas. No primeiro poço aplicou-se 2 μ L de marcador e nos restantes aplicou-se 1 μ L amostra + 4 μ L tampão de eluição.. Legenda: 1- Marcador λ -DNA-BstE *digest* 200 ng; 2- WP-PCR HBP7; 3- WP-PCR HBP7controle; 4- WP-PCR HBP8; 5- WP-PCR HBP8controle; 6- WP-PCR HBP9; 7- WP-PCR HBP9controle; 8- WP-PCR HBP10; 9- WP-PCR HBP10controle; 10- WP-PCR HBP11; 11- WP-PCR HBP11controle; 12- Marcador λ -DNA-BstE *digest* 200 ng; 13- WP-PCR HBP12; 14- WP-PCR HBP12controle; 15- WP-PCR HBP13; 16- WP-PCR HBP13controle; 17- WP-PCR HBP14; 18- WP-PCR HBP14controle.

Através da análise dos géis da figura 37, poder-se-á dizer que o tratamento com a enzima *DpnI* foi eficiente uma vez que nas amostras controle surgem bandas correspondentes às do DNA plasmídico metilado, pNJ2, que entretanto foi digerido pela enzima, tornando-se linear e consequentemente migrando mais rapidamente. Nas colunas dos produtos de WP-PCR tratados com *DpnI*, estas bandas não aparecem uma vez que o DNA plasmídico os *megaprimers* presentes foram usados nas reacções de PCR o que indica que estas reacções foram realizadas com sucesso.

3.4 Transformação de células competentes

Amostra	Resultados Esperados	Resultados Obtidos
No DNA	0 colonies	0
pNJ2	> 50	>>100
HBP 7	++++++	>30
HBP 7 _{controle}	-----	5
HBP 8	++++++	11
HBP 8 _{controle}	-----	0
HBP 9	++++++	11
HBP 9 _{controle}	-----	2
HBP 10	++++++	> 30
HBP 10 _{controle}	-----	2
HBP 11	++++++	>30
HBP 11 _{controle}	-----	5
HBP 12	++++++	>30
HBP 12 _{controle}	-----	6
HBP 13	++++++	>30
HBP 13 _{controle}	-----	0
HBP 14	++++++	>30
HBP 14 _{controle}	-----	4

Tabela 9. Número de colónias obtidas em placas LB, com ampicilina 50 mg/mL, (incubadas a 37°C durante 12 a 16 horas) através de espalhamento de 300 µL de células DH5α transformadas com os produtos de MEGAWHOP e respectivos controles.

Na análise dos resultados da tabela 9 podemos concluir que relativamente ao controlo positivo, as células são competentes uma vez que se obtiveram um grande número de colónias. O controlo negativo com zero colónias indica-nos que não houve contaminações e que o antibiótico presente nas placas se encontra viável, uma vez que as células competentes DH5α não possuem resistência a este antibiótico.

A presença de algumas colónias nos controlos das várias amostras poderão ser devidas a uma baixa actividade da enzima DpnI, podendo estar presentes células DH5 α com o plasmídeo modelo pNJ2.

As colónias presentes nas placas dos possíveis mutantes, foram picadas para inoculação e posterior purificação de DNA:

3.5 Preparação de DNA para sequenciação

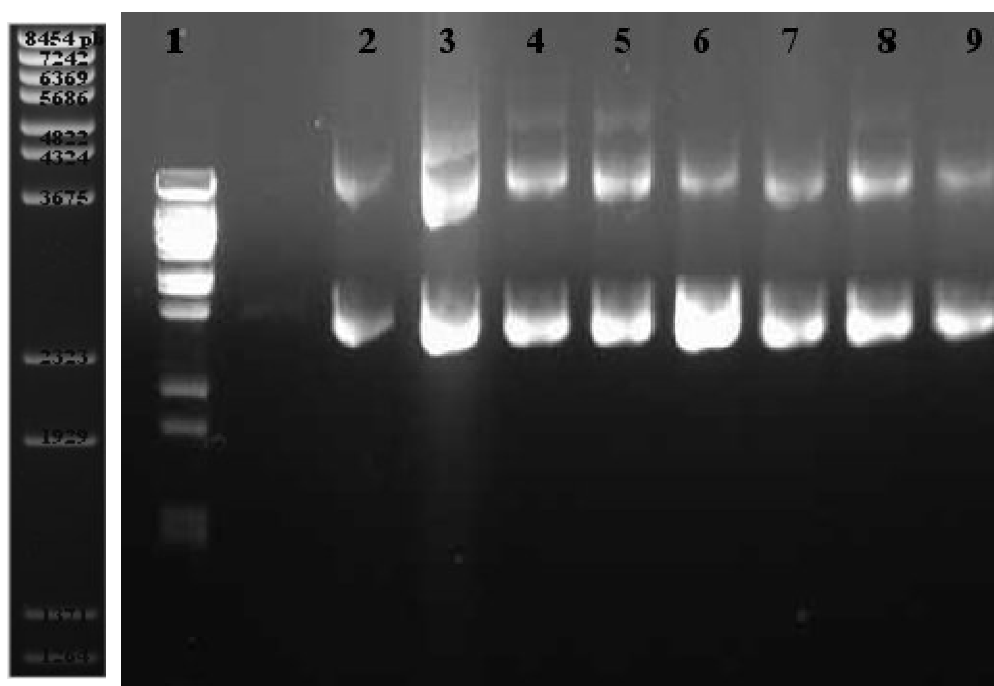


Figura 38. Gel de agarose 1% das preparações de DNA para sequenciação. No primeiro poço aplicou-se 2 μ L de marcador e nos restantes aplicou-se 1 μ L amostra + 4 μ L tampão de eluição. Legenda: 1- Marcador λ -DNA-BstE *digest* 200 ng; 2 DNA HBP 7; 40 ng/ μ L; 3- DNA HBP8 70 ng/ μ L; 4- DNA HBP9 55 ng/ μ L; 5- DNA HBP10 55 ng/ μ L; 6- DNA HBP11 55 ng/ μ L; 7- DNA HBP12 45 ng/ μ L; 8- DNA HBP13 55 ng/ μ L; 9- DNA HBP14 50 ng/ μ L.

A quantificação das amostras de DNA fez-se por comparação das bandas de cada amostra, com as bandas que compõem o marcador λ DNA-BstE *digest* (200 ng). Assim sendo, sabendo a quantidade de DNA presente em cada banda do marcador, e por comparação da intensidade das bandas das amostras, poder-se-á quantificar de forma relativa o DNA de cada amostra.

Na figura 38, à esquerda, pode-se observar com maior detalhe as bandas *standard* do marcador λ DNA-BstE II, às quais correspondem um determinado número de pares de bases. Sabendo que 200 ng de DNA estão divididos pela totalidade dos 48502 pares de bases, sabendo aproximadamente quantos pares de bases corresponde as bandas de cada amostra, chega-se a um valor relativo da quantidade de DNA presente

3.6 Sequenciação

As mutações R56A, R56E e K56A/K64A, correspondentes aos variantes HBP8, HBP11 e HBP14 respectivamente, foram introduzidas com sucesso no plasmídeo pNJ2 obtendo-se assim os variantes pretendidos (figura 39, 40 e 41). Para os outros possíveis variantes, os resultados obtidos indicaram que as mutações não foram introduzidas sendo a sequência do possível mutante igual ao do plasmídeo modelo, pNJ2, como exemplificado na figura 42, para o caso da mutação K64A correspondente ao variante HBP9.

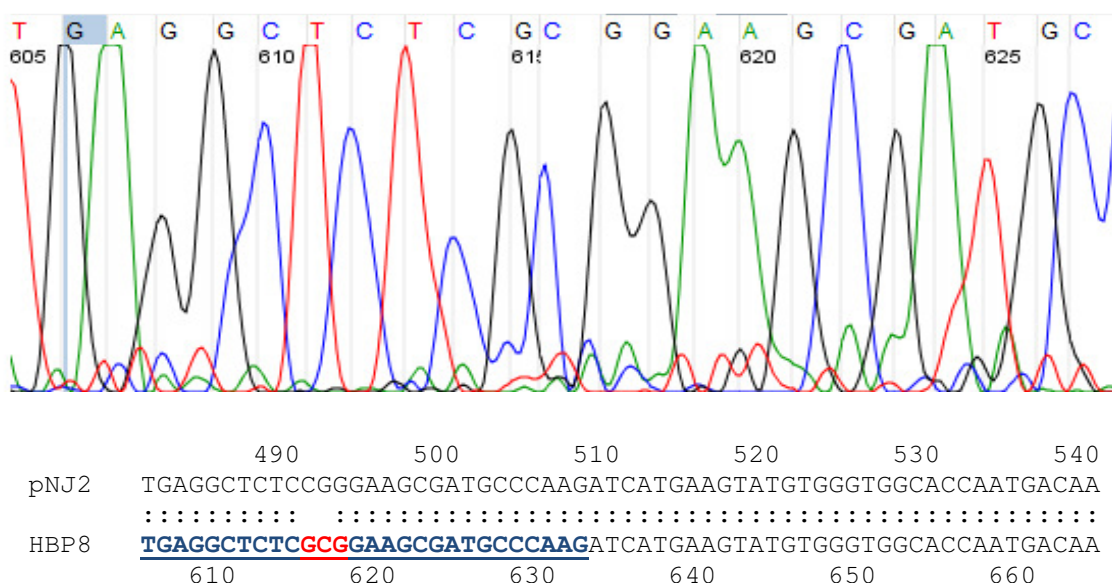


Figura 39. Cromatograma obtido por sequenciação do variante R56A (HBP8) e respectiva sequência indicando o local de mutação (a vermelho) introduzida pelo *primer* (a azul).

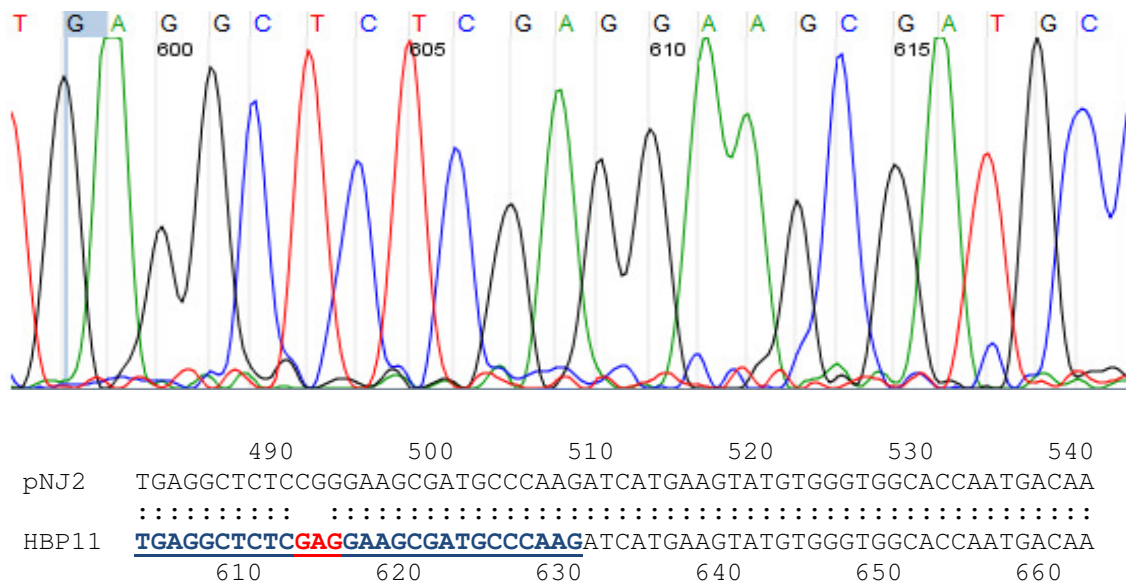


Figura 40 Cromatograma obtido por sequenciação do variante R56E (HBP11) e respectiva sequência indicando o local de mutação (a vermelho) introduzida pelo *primer* (a azul).

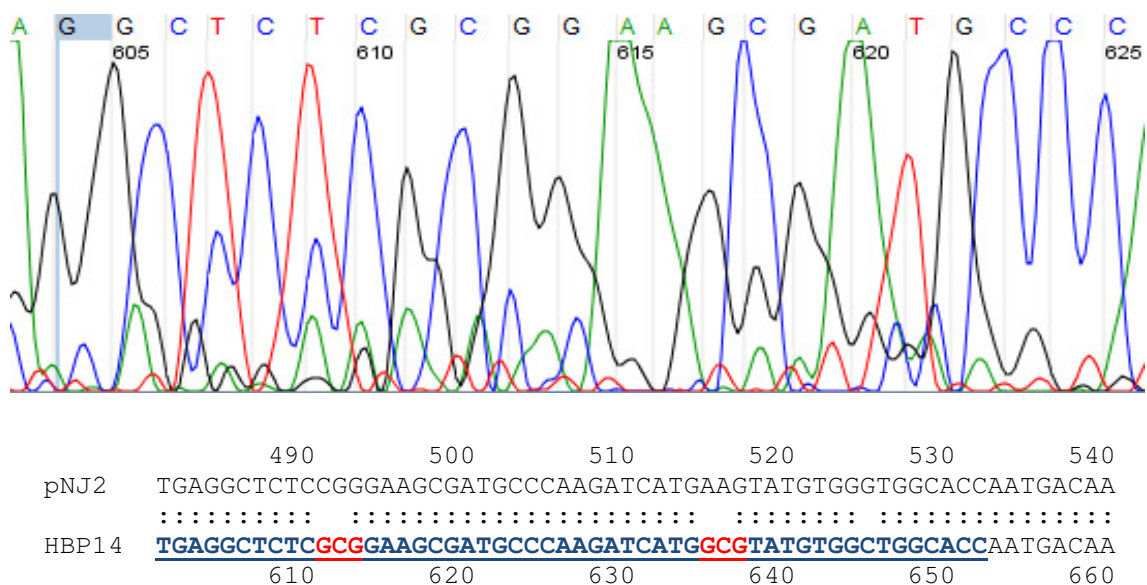


Figura 41. Cromatograma obtido por sequenciação do variante R56A/K64A (HBP14) e respectiva sequência indicando o local de mutação (a vermelho) introduzida pelo *primer* (a azul).

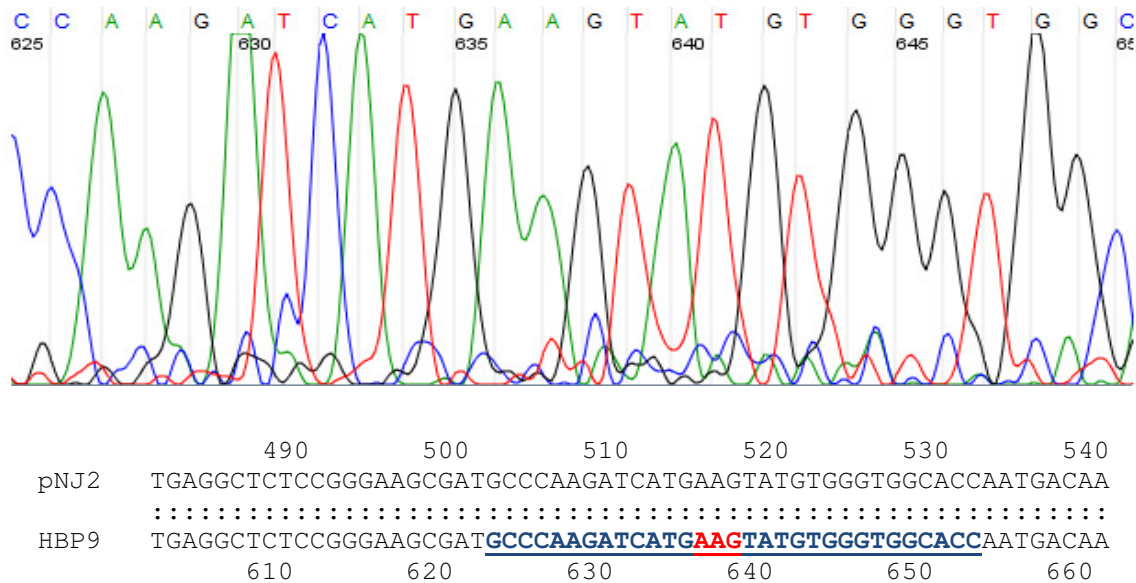


Figura 42. Cromatograma obtido por sequencição do variante K64A (HBP9) e respectiva sequência indicando o local de mutação (a vermelho) introduzida pelo *primer* (a azul).

4 Discussão

A construção de variantes de HBP através do método de *MEGA-WHOP*, como se pode verificar pelos resultados de sequencição, só foi bem sucedida do caso dos variantes R56A, R56E e R56A/K64A. Estes resultados são consequência de algumas falhas pontuais cometidas durante a construção destes variantes, falhas essas que poderão ter sido cometidas na construção dos *megaprimers* ou mesmo na transformação das células competentes.

Assumindo que os *megaprimers* foram construídos correctamente através das reacções de PCR, algumas reacções de *WP-PCR* dos tubos situados na periferia do termociclador poderão não ter atingido as temperaturas programadas impedindo assim a desnaturação da dupla cadeia ou o *annealing* por parte da polimerase.

Relativamente aos *megaprimers*, em determinadas situações poderão formar estruturas secundárias que afectam negativamente a extensão da cadeia de DNA molde através da polimerase. Para além disso poderá também ocorrer o re-emparelhamento da dupla cadeia de DNA do megaprimer, impedindo assim o emparelhamento ao DNA plasmídico.

Outra situação que poderá ter ocorrido foi a não digestão por parte da enzima DpnI de alguns produtos de WP-PCR. Este facto não poderá no entanto ser comprovado pelo gel de agarose respectivo uma vez não aparecerem bandas de DNA linear nas respectivas amostras.

Neste processo de mutagénese dirigida existem, no entanto, alguns cuidados que se devem tomar nomeadamente a correcta e inequívoca identificação dos tubos de PCR, para que não se confunda as reacções de construção de *megaprimers* com as reacções de WP-PCR.

Outro cuidado a ter é a manutenção dos tubos à temperatura óptima de actuação da enzima DpnI, através do controlo rigoroso da temperatura do banho onde os tubos de PCR vão ser incubados.

Uma vez que os variantes foram preparados todos de igual forma, pelo mesmo operador, não se poderá apontar falhas exactas dos métodos usados uma vez que estes foram eficazes no caso de três variantes.

Considerações Finais

Após a finalização desta etapa, e fazendo uma retrospectiva de todo o trabalho realizado poderei tecer alguns conclusões sobre os resultados aqui apresentados e sobre aquilo que aprendi durante a elaboração desta dissertação.

A optimização do processo de purificação de mHBP/SOUL permitiu-me aprofundar conhecimentos sobre os métodos de purificação proteica principalmente no que respeita à lise celular, cromatografia de afinidade e a interpretação por SDS-PAGE. Esta optimização permitiu por outro lado construir um protocolo adequado aos meios disponíveis em laboratório, não sendo necessário a etapas adicionais de purificação através de sistemas mais dispendiosos.

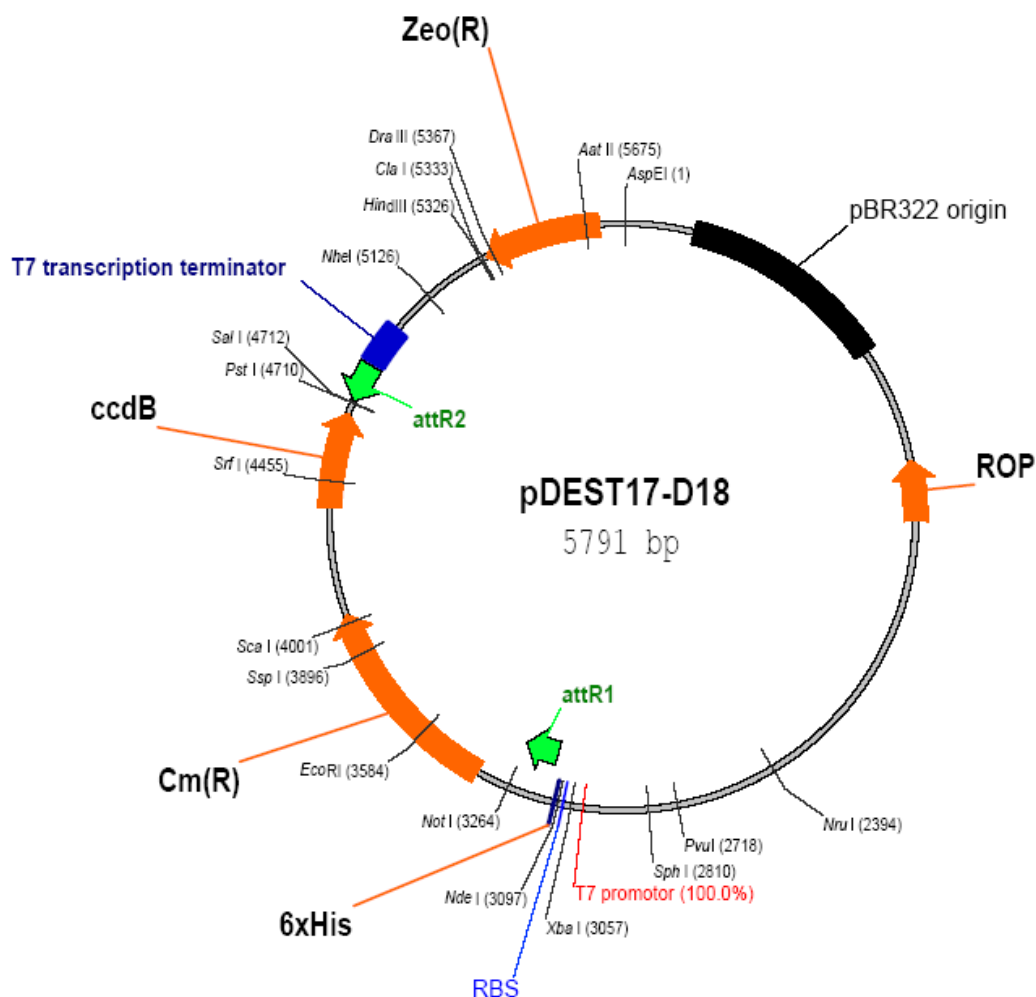
Os estudos de extinção de fluorescência da mHBP e respectivos variantes com a Hemina e PPIX, revelaram que a alteração da polaridade nos resíduos previamente seleccionados, M59, M63 e R181 não alterou a afinidade destas proteínas com os grupos tetrapirrólicos. Assim sendo, será fundamental para a compreensão da forma de interacção destas biomoléculas, a continuação dos estudos de extinção de fluorescência com os variantes propostos no capítulo III.

A construção de variantes de mHBP, através do processo de MEGA-WHOP, alargou consideravelmente os meus conhecimentos sobre manipulação, isolamento e purificação de DNA. A repetição dos processos de MEGA-WHOP para os variantes que não foram bem sucedidos, embora não seja descrita nesta dissertação, dará continuidade aos objectivos aqui propostos.

O carácter transversal dos conteúdos abordados nesta dissertação permitiu o aprofundamento dos conhecimentos em métodos biomoleculares, e a oportunidade de pôr em prática as diferentes técnicas referenciadas tornou-se numa experiência bastante enriquecedora.

Anexos

1 Plasmídeo hSOUL/IOH3379-pDEST17-D18



Descrição:

Tamanho: 5791 pb

Função: Expressão proteica em *E.coli*, N-terminal His6 tag.

Promotores: T7

Resistência antibiótico: Zeocina

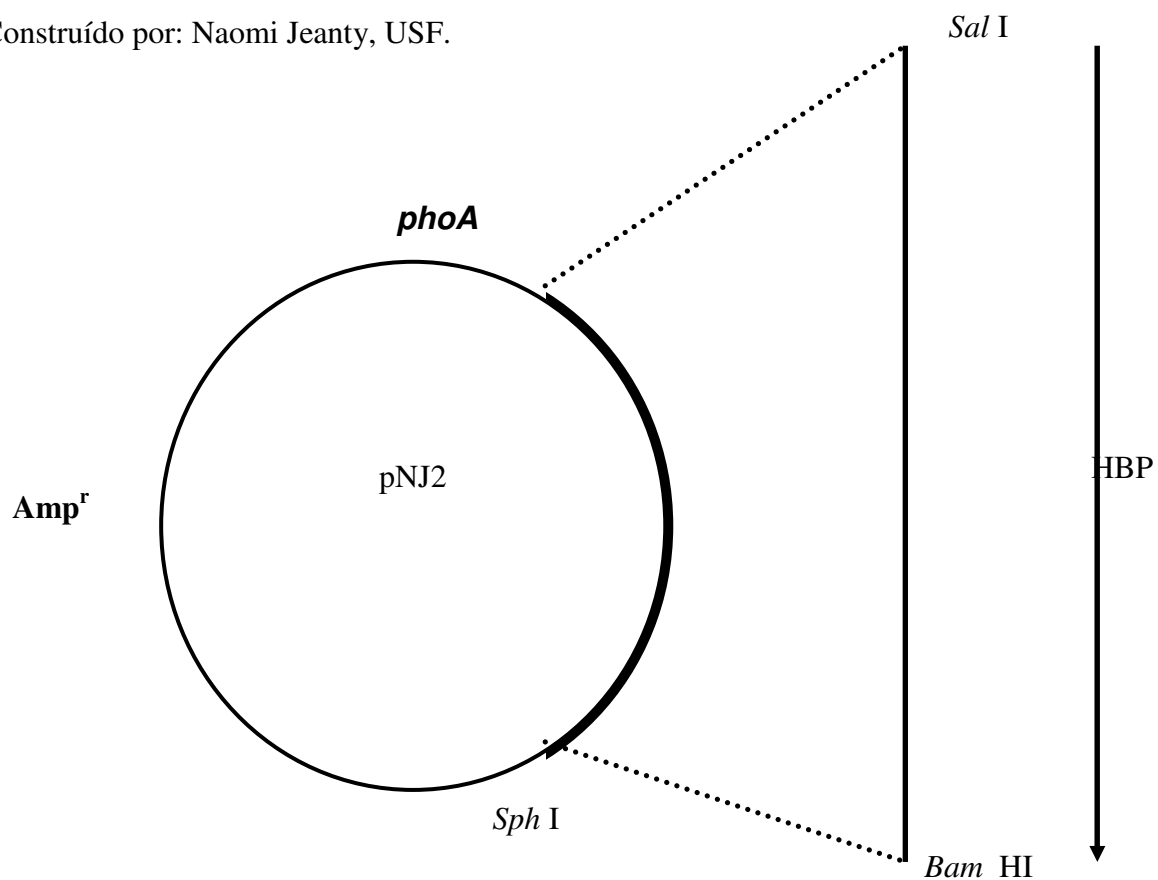
ori: pBR322

Comentários: o gene que codifica a resistência à ampicilina foi substituído pelo gene que codifica resistência à Zeocina.

2 Plasmídeo pNJ2

Data: Janeiro 2001

Construído por: Naomi Jeanty, USF.



Descrição:

O plasmídeo pNJ2 foi construído pela subclonagem de um fragmento amplificado por PCR que codifica a mHBP no vector pGF23, previamente digerido com Sal I e Bam HI. Foi usado como DNA modelo em PCR, o plasmídeo para a mHBP, um primer 5' contendo a sequência para a SalI, 6 resíduos de Histidina (His-tag) e os primeiros aminoácidos da mHBP, e um primer 3' contendo a sequência para os 6 últimos aminoácidos do terminal carboxílico e a Bam HI.

Resistência antibiótico Ampicilina

Sequenciado: sim

Vector: pGF23

Células: DH5α

Sequência:

TTCTCATGTT	TGACAGCTTA	TCATCGATAA	GCTTTGGAGA	TTATCGTCAC
TGCAATGCTT	CGCAATATGG	CGCAAAATGA	CCAACAGCGG	TTGATTGATC
AGGTAGAGGG	GGCGCTGTAC	GAGGTAAAGC	CCGATGCCAG	CATTCCTGAC
GACGATACGG	AGCTGCTGCG	CGATTACGTA	AAGAAGTTAT	TGAAGCATCC
TCGTCAGTAA	AAAGTTAATC	TTTTCAACAG	CTGTCATAAA	GTTGTCACGG
CCGAGACTTA	TAGTCGCTTT	GTTTTTATTT	TTTAATGTAT	TTGTACATGG
AGAAAATAAA	GTGAAACAGT	CGACTCACCA	CCACCACCAC	CACAACTCAC
TGTTTCGGGAG	CGTGGAACG	TGGCCTTGGC	AGGTTCTAAG	CACCGGGGGC
AAGGAAGATG	TCTCCTATGA	GGAAAGAGCC	TGTGAAGGGG	GCAAGTTTGC
TACTGTGGAA	GTGACAGACA	AGCCAGTGGA	TGAGGCTCTC	CGGGAAGCGA
TGCCCAAGAT	CATGAAGTAT	GTGGGTGGCA	CCAATGACAA	AGGAGTCGGC
ATGGGTATGA	CAGTCCCTGT	CTCTTTTGCC	GTGTTTCCCA	ATGAAGATGG
CTCCCTACAG	AAGAACTGA	AAGTCTGGTT	CCGGATTCCG	AACCAATTTT
AAGGCAGCCC	ACCGGCCCCC	AGTGACGAGA	GTGTGAAGAT	CGAGGAACGG
GAGGGCATCA	CTGTCTATT	CACGCAATTT	GGAGGCTATG	CCAAGGAAGC
AGACTATGTT	GCTCATGCCA	CCCAGCTACG	GACCACACTG	GAGGGCACAC
CAGCGACCTA	CCAGGGTGAT	GTCTACTACT	GCGCCGGATA	TGACCCTCCC
ATGAAGCCCT	ATGGACGCCG	TAACGAGGTC	TGGCTTGTA	AGGCAATGAGG
ATCCTCTACG	CCGGACGCAT	CGTGGCCGGC	ATCACCGGCG	CCACAGGTGC
GGTTGCTGGC	GCCTATATCG	CCGACATCAC	CGATGGGGAA	GATCGGGCTC
GCCACTTCGG	GCTCATGAGC	GCTTGTTTCG	GCGTGGGTAT	GGTGGCAGGC
CCCGTGGCCG	GGGGACTGTT	GGGCGCCATC	TCCTTGCAATG	CACCATTCTT
TGCGGCGGGC	GTGCTCAACG	GCCTCAACCT	ACTACTGGGC	TGCTTCCTAA
TGCAGGAGTC	GCATAAGGGA	GAGCGTCGAT	CGACCGATGC	CCTTGAGAGC
CTTCAACCCA	GTCAGTCTCT	TCCGGTGGGC	GCGGGGCATG	ACTATCGTCG
CCGCACTTAT	GACTGTCTTC	TTTATCATGC	AACTCGTAGG	ACAGGTGCCG
GCAGCGCTCT	GGGTCATTTT	CGGCGAGGAC	CGCTTTCGCT	GGAGCGCGAC
GATGATCGGC	CTGTCGCTTG	CGGTATTCGG	AATCTTGCAC	GCCCTCGCTC
AAGCCTTCGT	CACTGGTCCC	GCCACCAAAC	GTTTCGGCGA	GAAGCAGGCC
ATTATCGCCG	GCATGGCGGC	CGACGCGCTG	GGCTACGTCT	TGCTGGCGTT
CGCGACGCGA	GGCTGGATGG	CCTTCCCCAT	TATGATTCTT	CTCGCTTCCG
GCGGCATCGG	GATGCCCGCG	TTGCAGGCCA	TGCTGTCCAG	GCAGGTAGAT
GACGACCATC	AGGGACAGCT	TCAAGGATCG	CTCGCGGCTC	TTACCAGCCT
AACTTCGATC	ATTGGACCGC	TGATCGTCAC	GGCGATTTAT	GCCGCCTCGG
CGAGCACATG	GAACGGGTTG	GCATGGATTG	TAGGCGCCGC	CCTATACCTT
GTCTGCCTCC	CCGCGTTGCG	TCGCGGTGCA	TGGAGCCGGG	CCACCTCGAC
CTGAATGGAA	GCCGGCGGCA	CCTCGCTAAC	GGATTACCA	CTCCAAGAAT
TGGAGCCAAT	CAATTCTTGC	GGAGAACTGT	GAATGCGCAA	ACCAACCCTT
GGCAGAACAT	ATCCATCGCG	TCCGCCATCT	CCAGCAGCCG	CACGCGGCGC
ATCTCGGGCA	GCGTTGGGTC	CTGGCCACGG	GTGCGCATGA	TCGTGCTCCT
GTCGTTGAGG	ACCCGGCTAG	GCTGGCGGGG	TTGCCTTACT	GGTTAGCAGA
ATGAATCACC	GATACGCGAG	CGAACGTGAA	GCGACTGCTG	CTGCAAAACG
TCTGCGACCT	GAGCAACAAC	ATGAATGGTC	TTCGGTTTCC	GTGTTTCGTA
AAGTCTGGAA	ACGCGGAAGT	CAGCGCCCTG	CACCATTATG	TTCCGGATCT
GCATCGCAGG	ATGCTGCTGG	CTACCCTGTG	GAACACCTAC	ATCTGTATTA
ACGAAGCGCT	GGCATTGACC	CTGAGTGATT	TTTCTCTGGT	CCCGCCGCAT

CCATACCGCC	AGTTGTTTAC	CCTCACAACG	TTCCAGTAAC	CGGGCATGTT
CATCATCAGT	AACCCGTATC	GTGAGCATCC	TCTCTCGTTT	CATCGGTATC
ATTACCCCCA	TGAACAGAAA	TCCCCCTTAC	ACGGAGGCAT	CAGTGACCAA
ACAGGAAAAA	ACCGCCCTTA	ACATGGCCCG	CTTTATCAGA	AGCCAGACAT
TAACGCTTCT	GGAGAAACTC	AACGAGCTGG	ACGCGGATGA	ACAGGCAGAC
ATCTGTGAAT	CGCTTCACGA	CCACGCTGAT	GAGCTTTACC	GCAGCTGCCT
CGCGCGTTTC	GGTGATGACG	GTGAAAACCT	CTGACACATG	CAGCTCCCGG
AGACGGTCAC	AGCTTGTCTG	TAAGCGGATG	CCGGGAGCAG	ACAAGCCCGT
CAGGGCGCGT	CAGCGGGTGT	TGGCGGGTGT	CGGGGCGCAG	CCATGACCCA
GTCACGTAGC	GATAGCGGAG	TGTATACTGG	CTTAACATATG	CGGCATCAGA
GCAGATTGTA	CTGAGAGTGC	ACCATATGCG	GTGTGAAATA	CCGCACAGAT
GCGTAAGGAG	AAAATACCGC	ATCAGGCGCT	CTTCCGCTTC	CTCGCTCACT
GACTCGCTGC	GCTCGGTCTG	TCGGCTGCGG	CGAGCGGTAT	CAGCTCACTC
AAAGGCGGTA	ATACGGTTAT	CCACAGAATC	AGGGGATAAC	GCAGGAAAGA
ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	CAAAAGGCCA	GGAACCGTAA	AAAGGCCGCG
TTGCTGGCGT	TTTTCCATAG	GCTCCGCCCC	CCTGACGAGC	ATCACAAAAA
TCGACGCTCA	AGTCAGAGGT	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	TAAAGATACC
AGGCGTTTTCC	CCCTGGAAGC	TCCCTCGTGC	GCTCTCCTGT	TCCGACCCTG
CCGCTTACCG	GATACCTGTC	CGCCTTTCTC	CCTTCGGGAA	GCGTGCGCGT
TTCTCATAGC	TCACGCTGTA	GGTATCTCAG	TTCGGTGTAG	GTCGTTGCGT
CCAAGCTGGG	CTGTGTGCAC	GAACCCCCCG	TTAGCCCCGA	CCGCTGCGCC
TTATCCGGTA	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	CCGGTAAGAC	ACGACTTATC
GCCACTGGCA	GCAGCCACTG	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	AGGTATGTAG
GCGGTGCTAC	AGAGTTCTTG	AAGTGGTGCG	CTAACTACGG	CTACACTAGA
AGGACAGTAT	TTGGTATCTG	CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA	CCTTCGGAAA
AAGAGTTGGT	AGCTCTTGAT	CCGGCAAACA	AACCACCGCT	GGTAGCGGGT
GTTTTTTTGT	TTGCAAGCAG	CAGATTACGC	GCAGAAAAAA	AGGATCTCAA
GAAGATCCTT	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	GACGCTCAGT	GGAACGAAAA
CTCACGTAA	GGGATTTTGG	TCATGAGATT	ATCAAAAAGG	ATCTTCACCT
AGATCCTTTT	AAATTAATAA	TGAAGTTTTA	AATCAATCTA	AAGTATATAT
GAGTAAACTT	GGTCTGACAG	TTACCAATGC	TTAATCAGTG	AGGCACCTAT
CTCAGCGATC	TGTCTATTTT	GTTTCATCCAT	AGTTGCCTGA	CTCCCCGTCG
TGTAGATAAC	TACGATACGG	GAGGGCTTAC	CATCTGGCCC	CAGTGCTGCA
ATGATACCGC	GAGACCCACG	CTCACCGGCT	CCAGATTTAT	CAGCAATAAA
CCAGCCAGCC	GGAAGGGCCG	AGCGCAGAAG	TGGTCCTGCA	ACTTTATCCG
CCTCCATCCA	GTCTATTAAT	TGTTGCCGGG	AAGCTAGAGT	AAGTAGTTTCG
CCAGTTAATA	GTTTGCGCAA	CGTTGTTGCC	ATTGCTGCAG	GCATCGTGGT
GTCACGCTCG	TCGTTTGGA	TGGCTTCATT	CAGCTCCGGT	TCCCAACGAT
CAAGGCGAGT	TACATGATCC	CCCATGTTGT	GCAAAAAAGC	GGTTAGCTCC
TTCGGTCCCTC	CGATCGTTGT	CAGAAGTAAG	TTGGCCGCAG	TGTTATCACT
CATGGTTATG	GCAGCACTGC	ATAATTCTCT	TACTGTCATG	CCATCCGTAA
GATGCTTTTC	TGTGACTGGT	GAGTACTCAA	CCAAGTCATT	CTGAGAATAG
TGTATGCGGC	GACCGAGTTG	CTCTTGCCCG	GCGTCAACAC	GGGATAATAC
CGCGCCACAT	AGCAGAACTT	TAAAAGTGCT	CATCATTGGA	AAACGTTCTT
CGGGGCGAAA	ACTCTCAAGG	ATCTTACCGC	TGTTGAGATC	CAGTTCGATG
TAACCCACTC	GTGCACCCAA	CTGATCTTCA	GCATCTTTTA	CTTTCACCAG
CGTTTCTGGG	TGAGCAAAAA	CAGGAAGGCA	AAATGCCGCA	AAAAAGGGAA
TAAGGGCGAC	ACGGAAATGT	TGAATACTCA	TACTCTTCCT	TTTTCAATAT
TATTGAAGCA	TTTATCAGGG	TTATTGTCTC	ATGAGCGGAT	ACATATTTGA

ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCCGAA
 AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATT AATCATGAC ATTAACCTAT
 AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT CTTCAAGAA

AAC = codon for N-terminal HBP asparagine(**N**SLFGSVE...)

TGA = stop codon

CAC CAC CAC CAC CAC CAC = N-terminal hexa-His tag

GTG = initiation codon for alkaline phosphatase presequence

GTCGAC = *Sal* I cloning site

GGATCC = *Bam* HI cloning site

AG *CTGTCATAAA* *GTTGTCACGG* *CCGAGACTTA* *TAGTCGCT* = *phoA* promoter
 (PHO-box and the -10 sequence are in italics and underlined,
 respectively).

3 Soluções para a sobre-expressão de HBP

Solução M (1 L)		Solução T (100 mL)	
MOPS	42,0 g	HCl (conc.)	8 mL
Tricina	4,0 g	CaCl ₂ .2H ₂ O	18,4 mg
NaCl	14,6 g	H ₃ BO ₃	64. mg
KOH	8,0 g	MnCl ₂ .4H ₂ O	40 mg
NH ₄ Cl	2,55 g	CoCl ₂ .6H ₂ O	18 mg
Dissolver em 700 mL. Ajustar a pH 7,3		CuCl ₂ .2H ₂ O	4 mg
7,4, e perfazer com H ₂ O até 1 L.		ZnCl ₂	340 mg
		Na ₂ MoO ₄	605 mg

Solução O (50 mL)
Dissolver 0,1 g de FeCl ₂ .4 H ₂ O em 10 mL HCl concentrado
Adicionar a 10 mL de H ₂ O para dissolver melhor.
Adicionar 1 mL de solução T
Adicionar 2,68 g de Mg Cl ₂ .6H ₂ O
Perfazer com H ₂ O até 50 mL.
Esterilizar por filtração 0,2 µm e armazenar à temperatura ambiente.

Solução P
Dissolver 13,6 g de KH ₂ PO ₄ em 100 mL de H ₂ O
Autoclavar

Solução S
Dissolver 4,8 g de K ₂ SO ₄ em 100 mL de H ₂ O.
Autoclavar

Referências Bibliográficas

1. Janson, L.R.a.J.-C., ed. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*. 2º ed. 1998, Wiley-Liss.
2. E.L.V Harris, S.A., *Protein Purification Methods: A practical approach*, ed. B.D.H. D. Rickwood. 1995: IRL Press.
3. Wink, M., ed. *An Introduction to Molecular Biotechnology*. 2006, WILEY-VCH.
4. QIAGEN, ed. *A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*. 2003.
5. Blackmon, B.J., et al., *Characterization of a human and mouse tetrapyrrole-binding protein*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002. **407**(2): p. 196-201.
6. Gell, D.A., et al., *A novel haem-binding interface in the 22 kDa haem-binding protein p22HBP*. Journal of Molecular Biology, 2006. **362**(2): p. 287-297.
7. Taketani, S., et al., *Molecular characterization of a newly identified heme-binding protein induced during differentiation of urine erythroleukemia cells*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(47): p. 31388-31394.
8. Babusiak, M., et al., *Identification of heme binding protein complexes in murine erythroleukemic cells: Study by a novel two-dimensional native separation - liquid chromatography and electrophoresis*. Proteomics, 2005. **5**(2): p. 340-350.
9. Migeotte, I., et al., *Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2*. Journal of Experimental Medicine, 2005. **201**(1): p. 83-93.
10. Dias, J.S., et al., *The first structure from the SOUL/HBP family of heme-binding proteins, murine p22HBP*. (vol 281, pg 31553, 2006). Journal of Biological Chemistry, 2006.
11. Sato, E., et al., *SOUL in mouse eyes is a new hexameric heme-binding protein with characteristic optical absorption, resonance Raman spectral, and heme-binding properties*. Biochemistry, 2004. **43**(44): p. 14189-14198.
12. Dias, J.d.S., *NMR studies of murine ALAS and murine p22HBP: two proteins involved in heme metabolism*, in *Faculdade de Ciências e Tecnologia*. 2007, Universidade Nova de Lisboa: Lisboa.
13. *Recombinant Protein Purification Handbook*. ed. G. Healthcare.
14. Scopes, R.K., *Protein Purification - principles and practice*, ed. C.R. Cantor. 1994: Springer.
15. Glazer A., N.H., *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. 1995, New York: W. H. Freeman and Company.

16. 2009 [cited; Available from: <http://www.molecularstation.com/molecular-biology-images>].
17. Veloso, A.C.A., *Optimização de estratégias de alimentação para a identificação de parâmetros de um modelo de E.coli. Utilização do modelo em Monitorização e Controlo*, in *Escola de Engenharia*. 2006, Universidade do Minho.
18. Lodish, H.B., A. et al, *Molecular Cell Biology*. 5ª ed, New York.
19. *Protein Purification Handbook*, A. Biosciences, Editor.
20. Healthcare, G., *Protein Electrophoresis*. 2009.
21. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3ª ed. 2006: Springer.
22. Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, W.-V.V. GmbH, Editor. 2001.
23. Matías Möller, A.D., *Protein Tryptophan Accessibility studied by Fluorescence Quenching*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2002. **30**(3): p. 175-178.
24. Swillens, S., *Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations - Practical Aid for Computer-Analysis*. Molecular Pharmacology, 1995. **47**(6): p. 1197-1203.
25. Cosby, N.L., Scott., *Site-Directed Mutagenesis*, in *Promega Notes Magazine*. 1997, Promega Corporation.
26. Weaver, R.F., *Molecular Biology*. 2º ed. 2002: Mc Graw Hill.
27. Brons-Poulsen, J., et al., *An improved PCR-based method for site directed mutagenesis using megaprimers*. Molecular and Cellular Probes, 1998. **12**(6): p. 345-348.
28. Miyazaki, K. and M. Takenouchi, *Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid*. Biotechniques, 2002. **33**(5): p. 1033-+.
29. Hanahan, D., J. Jessee, and F.R. Bloom, *Plasmid Transformation of Escherichia-Coli and Other Bacteria*. Methods in Enzymology, 1991. **204**: p. 63-113.
30. Calvin, N.M. and P.C. Hanawalt, *High-Efficiency Transformation of Bacterial-Cells by Electroporation*. Journal of Bacteriology, 1988. **170**(6): p. 2796-2801.
31. QIAGEN. *QIAGEN Plasmid Purification Handbook* 2005 [cited; Available from: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAGENPlasmidPurification_EN.pdf].
32. QIAGEN. *QIAquick PCR Purification Kit Protocol*. 2008 [cited 2008; Available from:]

<http://www1.qiagen.com/Products/DnaCleanup/GelPcrSiCleanupSystems/QIAquickPCR Purification Kit.aspx?r=1745#Tabs=t2>.

33. Florida, U.o. *DNA sequencing*. 2009 [cited; Available from: <http://langsat.biotech.ufl.edu/>.